

ELISA PEREZ

OBTENÇÃO DE EXTRATO PADRONIZADO DE *Mucuna pruriens* (L.) DC. E
CONTROLE DE QUALIDADE DE MATÉRIA-PRIMA E PRODUTO CONTENDO
Boswellia serrata ROXB.: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE
METODOLOGIAS ANALÍTICAS POR CLAE.

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química, Departamento de Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção de título de doutor em Química.

Orientador: Prof. Dr. Brás Heleno de Oliveira.

CURITIBA

2009

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, sempre em primeiro lugar. Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Química da UFPR, pela oportunidade oferecida, à UNICENTRO, CAPES, CNPQ, Stevia Farma Industrial e Apsen farmacêutica pelo suporte financeiro. Agradeço imensamente o Prof. Dr. Brás, pela grande contribuição e orientação nesse trabalho. Outros profissionais também auxiliaram nesse trabalho e devo a eles meu agradecimento especial: Me. Daniel Altino de Jesus, Prof. Dr. Patrício Peralta-Zamora, Profa. Dra. Beatriz Helena L. N. Sales Maia, Profa. Dra. Maria Aparecida B. Frazão Vital, Profa. Dra. Tomoe Nakashima e Enfer. Gefferson Alexandre de Freitas.

Desconfio que esses agradecimentos sempre estarão incompletos, pois são tantas as pessoas que nos apoiaram nesses quatro anos... Tentarei lembrar de todas. Primeiramente, meu esposo. Ro, sem você nada disso seria possível. Lembre-se sempre disso: sua paciência, amor, compreensão e apoio foi fundamental para que alcançássemos essa vitória. Obrigada, minha família, por compreender minha ausência, por me apoiar e orar por mim, sem vocês eu não teria conseguido.

Alexandre e Fernando: obrigada por entenderem quando a Madrinha/Tia não podia ficar com vocês... obrigada por “desenharem” nos artigos ou nos cadernos de experimentos... Vocês sempre me deixaram mais feliz!

Amigos, o que seríamos sem eles? Amigos dos labs: Jana, Clau, Ale, César, Julião, Cirene, Joy, Tati, Luzia, Daiane, Karina e Daniela, o que seria de mim nesse lab sem vocês? Patipet, o que seria desse trabalho sem a tua amizade amorosa e sincera??? Vocês são muito importantes para mim, e a amizade de vocês é algo imensurável. E as colegas estagiárias? Obrigada Aline, Amabile e Luciana, bem como meu muito obrigada às minhas alunas Amanda, Anne Louise, Lilian, Michely e Sheila, pelo apoio enorme.

Obrigada meus amigos pela torcida e pela paciência que tiveram comigo altamente estressada! Lá vai meu agradecimento à Dani, Ge, Márcia, Dieter, Saua, Mayumi, Márcia Serkes, Marta e Fernanda! Devo também a vocês essa conquista!

E obrigada aos animais de laboratório (“Lester”) – sem vocês isso não seria possível!

Dedico esse trabalho ao meu marido, minha família e principalmente, aos dois pequenos integrantes que aumentaram a família nesses quatro anos: Alexandre e Fernando!

RESUMO

Um dos problemas na pesquisa com produtos naturais é definir quais substâncias são responsáveis pela ação terapêutica e, a partir dessas, definir sua concentração terapêutica. A planta *Mucuna pruriens* (L.) DC. é usada para o tratamento do mal de Parkinson e a resina de *Boswellia serrata* Roxb. detêm ação antiinflamatória, sendo essas atividades comprovadas. Entretanto, essas plantas apresentam carência de métodos para a quantificação de marcadores. Uma ferramenta útil nesse caso é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), que propicia a separação de compostos e sua quantificação. Esse trabalho teve como objetivos desenvolver métodos de controle de qualidade para as espécies *M. pruriens* (L.) DC. e *B. serrata* Roxb., além do desenvolvimento de um extrato padronizado de *M. pruriens*. Foram utilizadas sementes de *M. pruriens* (L.) DC. de três variedades (cinza, preta e verde), bem como resina e comprimidos revestidos de *B. serrata* Roxb. Foram desenvolvidos e validados métodos para o doseamento de levodopa nas sementes e no plasma de animais por CLAE, além de quantificação de compostos fenólicos totais nas sementes por espectrometria no UV. A dopa foi isolada das sementes e sua pureza enantiomérica foi verificada por CLAE quiral. Um extrato padronizado foi desenvolvido com o método de *spray drying*. Já com a *B. serrata*, foram desenvolvidos e validados métodos para a quantificação de ácidos boswélícos (ácidos β -boswélíco, 11-ceto- β -boswélíco e 3-acetil-11-ceto- β -boswélíco) por CLAE em resina e em comprimidos revestidos, além da determinação de ácidos totais em resina por titulometria em meio não aquoso. Como resultados, destaca-se que os métodos desenvolvidos para doseamento de levodopa em sementes e no plasma foram precisos, exatos, lineares e robustos, sendo que os teores de levodopa nas variedades apresentaram-se em torno de 4%. O teor de fenólicos totais situou-se em aproximadamente 4%. A dopa isolada foi a L-(S)-dopa. Obteve-se um extrato de mucuna padronizado, com teor de levodopa em torno de 12%. Os dois métodos desenvolvidos para *B. serrata* apresentaram-se precisos, exatos e robustos. Há, na resina, cerca de 85% de ácidos totais expressos em ácido β -boswélíco, com os seguintes teores: 1,73% de ácido 11-ceto- β -boswélíco 0,85% de ácido 3-acetil-11-ceto- β -boswélíco e 5,56% de ácido β -boswélíco; nos comprimidos revestidos foram 0,98% de ácido 11-ceto- β -boswélíco, 0,48% de ácido 3-acetil-11-ceto- β -boswélíco e 2,67% e ácido β -boswélíco. Conclui-se que todos os métodos desenvolvidos podem ser utilizados em rotina analítica, bem como o extrato de *M. pruriens* obtido poderá ser aplicado como insumo farmacêutico na produção de um fitoterápico para o Mal de Parkinson.

Palavras-chave: *Mucuna*. *Boswellia*. CLAE. *spray drying*. separação quiral.

ABSTRACT

In the natural products research, a problem is to define which substances are responsible for the pharmacological action and about these compounds, to define their therapeutic concentrations. The plant *Mucuna pruriens* (L.) DC. showed pharmacological activity against Parkinson disease and *Boswellia serrata* Roxb. resin is used for the treatment of inflammatory diseases, and these actions are confirmed. However, these plants have lack of methods for the markers quantification. A useful tool, in this case, is the High Pressure Liquid Chromatography (HPLC), which provides the separation of compounds and their quantification. The objectives of this work were to develop quality control methods for two species: *M. pruriens* (L.) DC. e *B. serrata* Roxb., plus to develop of *M. pruriens* standardized extract. *M. pruriens* (L.) DC. seeds (gray, black and green varieties), *B. serrata* Roxb. resin and coated tablets were used. Methods for levodopa assay in seeds and in animals plasma were developed and validated by HPLC. Total phenolics in seeds were measured by UV spectrometry. The dopa was isolated of the seeds and its enantiomeric purity was showed by chiral HPLC. A standardized extract was obtained with spray drying method. Methods were developed and validated for the analysis from *B. serrata*, in quantification of boswellic acids (β -boswellic acid – BA, 11-keto- β -boswellic acid – KBA and 3-acetyl-11-keto- β -boswellic acid – AKBA) by HPLC in resin and coated tablets, besides the determination of total acids in resin by titration with non-aqueous medium. As results, the methods for the quantification of levodopa were accurate, precise, linear and robust. The levodopa assay in the varieties was around 4% and total phenolics content was too 4%. The isolated dopa was only L-(S)-dopa. An standardized extract was achieved, with 12% of levodopa. Both *B. serrata* methods were accurate, precise, linear and robust. There are 85% total acids expressed as BA in *B. serrata* resin, with com 1.73% KBA; 0.85% AKBA and 5.56% BA. Coated tablets containing 0.98% KBA; 0.48% AKBA and 2,67% BA. All developed methods can be used in analytical routine, and *M. pruriens* extract can be applied as pharmaceutical material at phytotherapeutic medication for Parkinson disease.

Key words: mucuna. boswellia. HPLC. spray drying. chiral separation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Seção A

FIGURA 1 – SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DA ESPÉCIE <i>MUCUNA PRURIENS</i> (L.) DC.....	4
FIGURA 2 - ENANTIÔMEROS DA DOPA	8
FIGURA 3 – ESQUEMA DA METABOLIZAÇÃO DA LEVODOPA EM HUMANOS.....	9
FIGURA 4 - ESTRUTURAS DE ALGUMAS TETRAIDROISOQUINOLINAS E MPTP	10
FIGURA 5 - ESTRUTURAS DE ALGUMAS ISOFLAVONAS	11
FIGURA 6 – ESQUEMA DE UM EQUIPAMENTO DE <i>SPRAY DRYER</i>	15
FIGURA 7 – CROMATOGRAMA DE AMOSTRA DE PÓ DE MUCUNA CINZA E ESPECTRO NO UV DO PADRÃO DE LEVODOPA E DO PICO EM 3,5 MIN *	33
FIGURA 8 - TEOR DE LEVODOPA NA EXTRAÇÃO EXAUSTIVA DE 0,0500 G DE MUCUNA CINZA	35
FIGURA 9 - GRÁFICO NORMAL DOS EFEITOS EM RELAÇÃO À EXTRAÇÃO DE LEVODOPA ($\alpha = 0,05$).....	37
FIGURA 10 - GRÁFICOS DO EFEITO PRINCIPAL “NÚMERO DE EXTRAÇÕES” (A) E DE INTERAÇÃO ENTRE “TEMPO E NÚMERO DE EXTRAÇÕES” (B) EM LEVODOPA (%).....	37
FIGURA 11 – ESTRUTURA DA LEVODOPA E PKAS CORRESPONDENTES	37
FIGURA 12 – CURVA ANALÍTICA DA LEVODOPA.....	39
FIGURA 13 – RECUPERAÇÃO DA LEVODOPA “PADRÃO” TESTADA (15 MG) E EM TRÊS CONCENTRAÇÕES COM PÓ DE MUCUNA PRETA (12, 18 E 24 MG).....	40
FIGURA 14 - GRÁFICO NORMAL DOS EFEITOS DE FLUXO E COMPOSIÇÃO DE FASE MÓVEL, NA SEPARAÇÃO DE LEVODOPA EM MUCUNA, EM RELAÇÃO A K' ($\alpha = 0,05$) (ROBUSTEZ)	42
FIGURA 15 - GRÁFICOS DOS EFEITOS PRINCIPAIS “FLUXO” (A) E “FASE MÓVEL” (B) NA SEPARAÇÃO DE LEVODOPA EM MUCUNA, EM RELAÇÃO A K'	42
FIGURA 16 - GRÁFICO NORMAL DOS EFEITOS FLUXO E COMPOSIÇÃO DE FASE MÓVEL, NA SEPARAÇÃO DE LEVODOPA EM MUCUNA, EM RELAÇÃO A $T_{5\%}$ (%) ($\alpha = 0,05$) (ROBUSTEZ). ..	43
FIGURA 17 - GRÁFICOS DOS EFEITOS PRINCIPAIS “FLUXO”(A) E “FASE MÓVEL”(B) NA SEPARAÇÃO DE LEVODOPA EM MUCUNA EM $T_{5\%}$	43
FIGURA 18 - GRÁFICO NORMAL DOS EFEITOS DE FLUXO E COMPOSIÇÃO DE FASE MÓVEL, NA SEPARAÇÃO DE LEVODOPA EM MUCUNA, EM RELAÇÃO A R (%) ($\alpha = 0,05$) (ROBUSTEZ)....	44
FIGURA 19 - GRÁFICOS DOS EFEITOS PRINCIPAIS “FLUXO” (A) E “FASE MÓVEL” (B) E DE INTERAÇÃO (C), NA SEPARAÇÃO DE LEVODOPA EM MUCUNA, EM R	44

FIGURA 20 - GRÁFICO NORMAL DOS EFEITOS EM RELAÇÃO AO TEOR DE LEVODOPA NO EXTRATO ATOMIZADO ($\alpha = 0,05$)	48
FIGURA 21 - GRÁFICOS DO EFEITO PRINCIPAL “CENTRIFUGAÇÃO” (A) E DE INTERAÇÃO ENTRE “VELOCIDADE” E “TEMPO DE AGITAÇÃO” (B) NO EXTRATO ATOMIZADO EM RELAÇÃO AO TEOR DE LEVODOPA (%)	49
FIGURA 22 - GRÁFICO NORMAL DOS EFEITOS DO EXTRATO ATOMIZADO EM RELAÇÃO AO PESO SECO ($\alpha = 0,05$)	50
FIGURA 23 - CROMATOGRAMA DE EP201 E ESPECTROS NO UV DO PICO EM 3,1 MIN E DA LEVODOPA PADRÃO	53
FIGURA 24 – ESPECTRO DA SUBSTÂNCIA EP201 NO INFRAVERMELHO	53
FIGURA 25 – ESPECTRO DE MASSAS DE EP201	54
FIGURA 26 - ESPECTRO DE RMN DE ^1H (400 MHz) DA SUBSTÂNCIA EP201 EM ÁGUA DEUTERADA	54
FIGURA 27 - REGIÃO ENTRE $\delta 6,69$ - $6,46$ PPM, DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE EP201, COM SINAIS DE ^1H EM ANEL AROMÁTICO (INTEGRAÇÃO PARA DOIS HIDROGÊNIO - $\int = 1,47$ E UM HIDROGÊNIO - $\int = 0,79$) (ÁGUA DEUTERADA, 400 MHz)	55
FIGURA 28 – REPRESENTAÇÃO DE ACOPLAMENTOS ENTRE H_f E H_d E ENTRE H_f E H_e NA MOLÉCULA DE LEVODOPA	56
FIGURA 29 - REGIÃO EM $\delta 3,45$ PPM, DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE EP201, COM SINAIS DE ^1H LIGADO AO CARBONO ASSIMÉTRICO (INTEGRAÇÃO PARA UM HIDROGÊNIO - $\int = 0,89$) (ÁGUA DEUTERADA, 400 MHz)	56
FIGURA 30 - REPRESENTAÇÕES DA MOLÉCULA DE LEVODOPA E ACOPLAMENTOS ENTRE H_a - H_b E H_a - H_c	57
FIGURA 31 - REGIÃO EM $\delta 2,97$ PPM, DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE EP201, COM SINAIS DE ^1H LIGADO AO CARBONO VIZINHO AO ESTEREOCENTRO (INTEGRAÇÃO PARA UM HIDROGÊNIO - $\int = 0,84$) (ÁGUA DEUTERADA, 400 MHz)	57
FIGURA 32 - REPRESENTAÇÕES DA MOLÉCULA DE LEVODOPA E ACOPLAMENTOS ENTRE H_b - H_a E H_b - H_c	58
FIGURA 33 - REGIÃO EM $\delta 2,69$ PPM DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE EP201, COM SINAIS DE ^1H LIGADO AO CARBONO VIZINHO AO ESTEREOCENTRO (INTEGRAÇÃO PARA UM HIDROGÊNIO - $\int = 0,82$) (ÁGUA DEUTERADA, 400 MHz)	58
FIGURA 34 - REPRESENTAÇÕES DA MOLÉCULA DE LEVODOPA E ACOPLAMENTOS ENTRE H_c - H_a E H_c - H_b	59

FIGURA 35 - REGIÃO EM TORNO DE $\delta 2,50$ PPM, DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE EP201, COM PROVÁVEL SINAL DOS ^1H DE AMINA, COM INTEGRAÇÃO PARA DOIS HIDROGÊNIO ($J=1,49$) (ÁGUA DEUTERADA, 400 MHz)	59
FIGURA 36 - REGIÃO EM $\delta 8,32$ PPM, DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE EP201, SINAL PROVÁVEL DE ^1H DE FENOL ($J=0,13$) (ÁGUA DEUTERADA, 400 MHz)	60
FIGURA 37 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C CONTEMPLANDO OS SINAIS DE EP201 E O SINAL DO DMSO- D_6 EM $\delta 39,4$ PPM (DMSO- D_6 , 100 MHz).....	60
FIGURA 38 - DETALHE DO ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C NA REGIÃO DO SEPTETO CORRESPONDENTE AO SINAL DO DMSO- D_6 (100 MHz)	61
FIGURA 39 - ESPECTRO DEPT 135 DE EP201 (DMSO- D_6 , 100 MHz).....	62
FIGURA 40 - ESTRUTURA DA DOPA	63
FIGURA 41 - COMPLEXAÇÃO DO SAL DE AMÔNIO PRIMÁRIO NA CAVIDADE QUIRAL DO ÉTER DE COROA, FASE ESTACIONÁRIA CHIROSIL RCA (+).....	64
FIGURA 42 - CROMATOGRAMA DA SEPARAÇÃO DOS ENANTIÔMEROS DA DOPA	65
FIGURA 43 - REPRESENTAÇÃO DO RECONHECIMENTO QUIRAL ENTRE FASE ESTACIONÁRIA E O ENANTIÔMERO MAIS FORTEMENTE RETIDO (<i>R</i>), COM A LIGAÇÃO DE HIDROGÊNIO ENTRE O HIDROGÊNIO DO ÁCIDO DO ÉTER E O OXIGÊNIO DA CARBONILA DO AMINOÁCIDO	66
FIGURA 44 - ESTRUTURAS DOS COMPLEXOS COM ÁCIDO (+)-(18-COROA-6)-2,3,11,12-TETRACARBOXÍLICO/ FENILGLICINA (LIGAÇÕES DE HIDROGÊNIO - LINHA PONTILHADA)...	67
FIGURA 45 - ESTRUTURAS DE ALGUNS AMINOÁCIDOS COM GRUPO VOLUMOSO NO CARBONO β E SEM GRUPO VOLUMOSO	67
FIGURA 46 - GRÁFICO NORMAL DOS EFEITOS EM RELAÇÃO A <i>R</i> (%) NA OTIMIZAÇÃO DA SEPARAÇÃO DOS ENANTIÔMEROS DA DOPA ($\alpha = 0,05$)	68
FIGURA 47 - EFEITOS SIGNIFICATIVOS E NÃO SIGNIFICATIVOS COM RELAÇÃO A <i>R</i> E O FLUXO ($\text{ML}.\text{MIN}^{-1}$), TIPO DO SOLVENTE (ACETONITRILA OU METANOL) E CONCENTRAÇÃO DO SOLVENTE (%) NA FASE MÓVEL NA SEPARAÇÃO DOS ENANTIÔMEROS DA DOPA	69
FIGURA 48 - GRÁFICOS DE INTERAÇÃO ENTRE AS VARIÁVEIS FLUXO ($\text{ML}.\text{MIN}^{-1}$), TIPO DO SOLVENTE (ACETONITRILA OU METANOL) E CONCENTRAÇÃO DO SOLVENTE (%) NA FASE MÓVEL, EM RELAÇÃO À <i>R</i> , NA SEPARAÇÃO DE ENANTIÔMEROS DA DOPA.....	69
FIGURA 49 - CROMATOGRAMA DA SEPARAÇÃO QUIRAL DE EP201	71
FIGURA 50 - ESQUEMA DE GERAÇÃO DA LEVODOPA A PARTIR DO FOSFOENOLPIRUVATO E ERITROSE 4-FOSFATO	72
FIGURA 51 - CURVA ANALÍTICA DO 3HC	73

FIGURA 52 - GRÁFICO NORMAL DOS EFEITOS EM RELAÇÃO AO DOSEAMENTO DE FENÓLICOS ($\alpha=0,05$).....	75
FIGURA 53 - GRÁFICOS DOS EFEITOS PRINCIPAIS “TIPO DE SOLVENTE (A), “PRESENÇA DE HCL” (B) E DE INTERAÇÃO ENTRE “TIPO DE SOLVENTE” E “PRESENÇA DE HCL” (C) EM RELAÇÃO AO DOSEAMENTO DE FENÓLICOS.....	75
FIGURA 54 - ESQUEMA DE SEPARAÇÃO ENTRE O ANALITO (BH^+) E O REAGENTE DE PAR IÔNICO NA CROMATOGRAFIA DE PAR IÔNICO	79
FIGURA 55 - CROMATOGRAMA DO PLASMA CONTAMINADO COM LEVODOPA, DOPAC, DOPAMINA, 3-O-METIL DOPA E DHBA*.....	81
FIGURA 56 - CURVA ANALÍTICA DA LEVODOPA EM PLASMA, UTILIZANDO SEPARAÇÃO COM PAR IÔNICO E DETECTOR ELETROQUÍMICO	83
FIGURA 57 – RECUPERAÇÃO DA LEVODOPA NO PLASMA EM CONCENTRAÇÃO ALTA ($0,50 \mu\text{G}.\text{mL}^{-1}$), MÉDIA ($0,30 \mu\text{G}.\text{mL}^{-1}$) E BAIXA ($0,10 \mu\text{G}.\text{mL}^{-1}$)	84
FIGURA 58 - CURVAS ANALÍTICA DA LEVODOPA PREPARADAS SOMENTE COM SOLVENTE (FASE MÓVEL) E NA MATRIZ (PLASMA BRANCO COM PREPARO DE AMOSTRA).....	86
FIGURA 59 - GRÁFICO NORMAL DOS EFEITOS DO TEOR DE METANOL E FLUXO NA SEPARAÇÃO DE LEVODOPA NO PLASMA EM RELAÇÃO A K' ($\alpha = 0,05$)	88
FIGURA 60 - GRÁFICOS DOS EFEITOS PRINCIPAIS “QUANTIDADE DE METANOL” (A) E “FLUXO” (B) EM RELAÇÃO A K'	88
FIGURA 61 - GRÁFICO NORMAL DOS EFEITOS DO TEOR DE METANOL E FLUXO NA SEPARAÇÃO DE LEVODOPA NO PLASMA EM RELAÇÃO A $T_{5\%}$ ($\alpha = 0,05$).....	89
FIGURA 62 - GRÁFICOS DOS EFEITOS PRINCIPAIS “QUANTIDADE DE METANOL” (A) E “FLUXO” (B) EM RELAÇÃO A $T_{5\%}$	89
FIGURA 63 - GRÁFICO NORMAL DOS EFEITOS DO TEOR DE METANOL E FLUXO NA SEPARAÇÃO DE LEVODOPA EM PLASMA EM RELAÇÃO A R ($\alpha = 0,05$).....	90
FIGURA 64 - GRÁFICOS DOS EFEITOS PRINCIPAIS “QUANTIDADE DE METANOL” (A) E “FLUXO” (B) EM RELAÇÃO A R	90
FIGURA 65 - CROMATOGRAMA DE PLASMA DE RATOS TRATADOS COM LEVODOPA E BENZERAZIDA ($100 \text{ MG}.\text{KG}^{-1}$ E $25 \text{ MG}.\text{KG}^{-1}$)	91
FIGURA 66 - ESTRUTURA DA BENZERAZIDA.....	91
FIGURA 67 – ESTRUTURAS DE ÁCIDOS BOSWÉLICOS PRESENTES NO GÊNERO <i>BOSWELLIA</i>	105
FIGURA 68 - CROMATOGRAMAS OBTIDOS DA RESINA DE <i>B. SERRATA</i> ROXB.*	117
FIGURA 69 - RECUPERAÇÃO DOS ÁCIDOS BOSWÉLICOS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE	

RESINA DE <i>B. SERRATA</i> COM GRANULADO-PLACEBO	121
FIGURA 70 - CURVA ANALÍTICA DO ÁCIDO BENZÓICO NA VOLUMETRIA EM MEIO NÃO AQUOSO COM NaOH 0,05 M	126
FIGURA 71 - RECUPERAÇÃO DO ÁCIDO BENZÓICO NA PRESENÇA DE EXTRATO SECO DE <i>B.</i> <i>SERRATA</i> EM ETANOL, TITULADO COM SOLUÇÃO AQUOSA DE NaOH 0,05 M.....	128

LISTA DE TABELAS

Seção A

TABELA 1 – MATRIZ DE CONTRASTES PARA A OTIMIZAÇÃO DO PREPARO DE AMOSTRA PARA A DETERMINAÇÃO DO TEOR DE LEVODOPA.....	36
TABELA 2 – TEOR DE LEVODOPA EM DIFERENTES MASSAS DE PÓ DE MUCUNA.....	41
TABELA 3 – MATRIZ DE CONTRASTES RELATIVA A ROBUSTEZ DO SISTEMA CROMATOGRÁFICO NA SEPARAÇÃO DA LEVODOPA EM MUCUNA.....	41
TABELA 4 - TEORES DE LEVODOPA EM PÓS DE GRANULOMETRIA INFERIOR A 0,59 MM EM VARIEDADES DE MUCUNA	45
TABELA 5 - PERCENTUAL RELATIVO AO TAMANHO DE PARTÍCULA EM PÓS DE VARIEDADES DE MUCUNA	46
TABELA 6 - GRANULOMETRIA E TEOR DE LEVODOPA EM VARIEDADES DE MUCUNA	46
TABELA 7 - MATRIZ DE CONTRASTES DA OTIMIZAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO EXTRATO SECO POR <i>SPRAY DRYING</i>	47
TABELA 8 – VALORES OBTIDOS DE PESO SECO E RENDIMENTOS ESPERADOS.....	50
TABELA 9 - TEORES DE LEVODOPA ESTIMADOS DAS 1 ^A E 2 ^A EXTRAÇÕES	51
TABELA 10 – TEOR DE LEVODOPA NO EXTRATO SECO ESTIMADO E NO ATOMIZADO	51
TABELA 11 - DESLOCAMENTOS QUÍMICOS OBTIDOS, RELATADOS EM LITERATURA E POSSÍVEIS AMBIENTES QUÍMICOS DE ¹³ C ENVOLVIDOS	61
TABELA 12 – MATRIZ DE CONTRASTES PARA A OTIMIZAÇÃO DA SEPARAÇÃO DE ENANTIÔMEROS DA DOPA	65
TABELA 13 - RESULTADOS DE K' ₁ , T _{5%} , R E FATOR DE SEPARAÇÃO DAS SEPARAÇÕES OBTIDAS POR PLANEJAMENTO FATORIAL.....	68
TABELA 14 – MATRIZ DE CONTRASTES DA OTIMIZAÇÃO PARA O DOSEAMENTO DE FENÓLICOS TOTAIS	74
TABELA 15 – TEOR DE LEVODOPA POR CLAE E DE FENÓLICOS TOTAIS POR UV NAS VARIEDADES DE MUCUNA	76
TABELA 16 - RESULTADOS DA ADEQUAÇÃO DO SISTEMA EM RELAÇÃO A K', R, N E T _{5%} DE DOPAC, LEVODOPA, HVA, 3OMD, DHBA E DOPAMINA EM PLASMA	81
TABELA 17 - RECUPERAÇÃO DE LEVODOPA EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES NO PLASMA	85
TABELA 18 – MATRIZ DE CONTRASTES REFERENTE À ROBUSTEZ DO SISTEMA CROMATOGRÁFICO NA SEPARAÇÃO DA LEVODOPA EM PLASMA.....	87

TABELA 19 - RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DE ADEQUAÇÃO DO SISTEMA.....	117
TABELA 20 - DADOS DE LINEARIDADE PARA O KBA, AKBA E BA	119
TABELA 21 - ESPECIFICIDADE DE GRANULADO CONTAMINADO E NÃO CONTAMINADO E TEOR DE BA, KBA E AKBA.....	119
TABELA 22 - REPETIBILIDADE DO TEOR DE BA, KBA E AKBA EM RELAÇÃO À RESINA OU O COMPRIMIDO REVESTIDO	120
TABELA 23 - ROBUSTEZ DO SISTEMA EM RELAÇÃO AO MÉTODO CROMATOGRAFICO	122
TABELA 24 - CONCENTRAÇÕES DE KBA, AKBA E BA, CITADAS EM LITERATURA	123
TABELA 25 - CONCENTRAÇÕES DE KBA, AKBA E BA ENCONTRADAS EM COMPRIMIDOS REVESTIDOS (N=10) E RESINA ANALISADA (N=3) (%).....	123
TABELA 26 – VALORES DA PADTONIZAÇÃO DE SOLUÇÃO AQUOSA DE NaOH 0,05 M.	123
TABELA 27 – RESULTADOS DA TITULAÇÃO DO EXTRATO SECO EM ÁGUA COM SOLUÇÃO AQUOSA DE NaOH 0,0505 M.	124
TABELA 28 - RESULTADOS DA TITULAÇÃO DE EXTRATO SECO EM ETANOL COM SOLUÇÃO AQUOSA DE NaOH 0,05 M	125
TABELA 29 - RESULTADOS DA TITULAÇÃO DE ÁCIDO BENZÓICO EM ETANOL COM SOLUÇÃO AQUOSA DE NaOH 0,05 M NO ENSAIO DE REPETIBILIDADE.....	127
TABELA 30 - RESULTADOS DA TITULAÇÃO DE ÁCIDO BENZÓICO EM ETANOL, NA PRESENÇA DE EXTRATO DE <i>B. SERRATA</i> COM SOLUÇÃO AQUOSA DE NaOH 0,05 M NO ENSAIO DE EXATIDÃO.....	127
TABELA 31 - RESULTADOS DO TESTE DE ROBUSTEZ PARA A VALIDAÇÃO DE ÁCIDOS TOTAIS NA TITULAÇÃO DE EXTRATO DE <i>B. SERRATA</i>	128

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E FÓRMULAS

θ - ângulo diedro de ligações
 δ - deslocamento químico
 α - nível de significância
 \angle C-C'-H - ângulo entre as ligações carbono e hidrogênio
 \angle H-C-C' - ângulo entre as ligações hidrogênio e carbono'
 μg - micrograma
 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ - micrograma por mililitro
 μL - microlitro
 μm - micrômetro
 $[\text{M-H}]^+$ - representação de íon de massa total menos um hidrogênio, na forma de cátion
[sic]- erro ortográfico ou lógico do texto citado
 \int - integral
 ^{13}C - isótopo de carbono com momento magnético diferente de zero (massa do núcleo igual a 13)
 ^1H - isótopo de hidrogênio com momento magnético diferente de zero (massa do núcleo igual a 1)
 $20 \text{ MoO}_3\text{P}_2\text{O}_5.51\text{H}_2\text{O}$ - ácido fosfomolibdico
 ^2J - duas ligações de distância entre átomos
 ^3HC - ácido 3-hidroxicinâmico
 ^3J - três ligações de distância entre átomos
 ^3OMD - 3-O-metil-dopa
 ^4J - quatro ligações de distância entre átomos
 5-LO - 5-lipoxigenase
 \AA - ângstron
ABNT - associação brasileira de normas técnicas
AKBA - 3-acetil-11-ceto- β -boswéllico
ANOVA - análise de variância
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
 b - tamanho da fração no planejamento fatorial
B. serrata - *Boswellia serrata* Roxb.
BA - ácido β -boswéllico
 BH^+ - analito na forma de base protonada
 $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{NO}_4$ - levodopa sem um hidrogênio
Carbono β - carbono a duas ligações do carbono da carbonila
CAT-A-PHASE - fase móvel comercial com reagente de par iônico não divulgado)
caudamento do pico a 5 % ($T_5\%$)
CCD - cromatografia em camada delgada
CEEa-UFPR - comitê de ética em experimentação animal
CLAE - cromatografia líquida de alta eficiência
CH - carbono com um hidrogênio
C-H - ligação carbono hidrogênio
 CH_2 - carbono com dois hidrogênios
 CH_3 - carbono com três hidrogênios
 CH_3COO - grupo acetato
 cm^{-1} - número de ondas
COMT - catecol-orto-metil-transferase
 COOH - carboxila

COX-1 - ciclooxygenase tipo 1
 COX-2 - ciclooxygenase tipo 2
 CT - concentração teórica adicionada
 CT - concentração teórica adicionada
 Cu (II) – íon cuproso
 D – configuração baseada no gliceraldeído
 D - dextrorotatório
 DAD – detector de fotodiodos
 DDC - dopa descarboxilase
 DEPT 135 - experimento de intensificação sem distorção por transferência de polarização
 DHBA - hidrobrometo de diidroxibenzilamina
 DMF - dimetilformamida
 DMSO- d_6 – dimetilsulfóxido com deutério
 DOPAC - ácido 3,4-diidroxifenilacético
 DP - desvio padrão
 DPR% - desvio padrão relativo
 EDTA - ácido etilenodiaminotetracético
 EGTA – ácido etilenoglicol-bis-(β -aminoetiléter)- N,N,N',N'-tetracético
 EP20 – líquido da extração etanólica
 EP201 – precipitado do líquido da extração etanólica
 ER% - erro relativo em percentual
 f - teste estatístico f – análise de variância
 fig. – figura
 g – grama
 g – gravidade
 g.100 mL^{-1} – grama por 100 mililitros
 g.mol^{-1} – massa molar
 G1 – fase de crescimento celular
 h – hora
 Ha – hidrogênio na posição a
 Hb – hidrogênio na posição b
 Hc – hidrogênio na posição c
 HCl – ácido clorídrico
 Hd – hidrogênio na posição d
 He – hidrogênio na posição e
 Hf – hidrogênio na posição f
 HVA - ácido homovanílico
 Hz – hertz
 i.d. - diâmetro interno
 IAPAR- Instituto Agrônomo do Paraná
 ICH - *International Conference of Harmonisation*
 IPC – cromatografia de par iônico
 IPR – reagente de par iônico
 k – fatores
 K' - fator capacidade
 KBA - ácido 11-ceto- β -boswéllico
 KBr – brometo de potássio
 kHz – quiloHertz
 L - configuração baseada no gliceraldeído

L - levorotatório
 L. – Linneu
 L.h⁻¹ – litro por hora
 L.min⁻¹ – litro por minuto
 LIQ – limite inferior de quantificação
 LT - leucotrienos
 M – molar
M. pruriens - *Mucuna pruriens* L.
 m/z – relação massa/carga
 m³.h⁻¹ – metro cúbico por hora
 MAO-B – monoaminoxidase tipo B
 Me - média da concentração dos valores
 mg.kg⁻¹ – miligrama por quilograma
 mg.mL⁻¹ - miligramas por mililitros
 MHz – megaHertz
 min – minuto
 mL – mililitro
 mL.min⁻¹ – mililitro por minuto
 mm – milímetro
 mM – milimolar
 mol - 6,22.10²³ unidades
 MP – mal de Parkinson
 MPTP - 1-metil-4-fenil-1,2,3,4-tetraidropiridina
 N – número de pratos teóricos
 n – número de replicatas
 Na₂CO₃ – carbonato de sódio
 Na₂WO₄.2H₂O - tungstato de sódio dihidratado
 NAD⁺ - nicotinamida adenina dinucleotídio
 NADH - nicotinamida adenina dinucleotídio forma reduzida
 NaOH – hidróxido de sódio
 NF-κB – fator de transcrição da resposta inflamatória
 -NH₂ – grupo amina
 -NH₃⁺ - grupo amino
 nm – nanômetro
 NP - difenilboriloxietilamina
 O – átomo de oxigênio
 O₂ – oxigênio molecular
 °C – graus Celsius
 O-H – ligação oxigênio hidrogênio
 OVAT – on variable at a time
p – índice inverso da confiança estatística
 p/v – relação peso por volume
 PA – para análise
 PEG - polietilenoglicol-4000
 ppm – partes por milhão
 psi – medida de pressão
 PVDF - fluoreto de polivinilideno
 qsp. - quantidade suficiente para
r – coeficiente de correlação linear
 R - resolução

R – configuração absoluta *R*
RDC – Resolução da Diretoria Colegiada
RMN – ressonância nuclear magnética
Roxb.- Roxburg
RPM – rotações por minuto
s – segundo
S – configuração absoluta *S*
S - enxofre
SNC - sistema nervoso central
SPE – extração em fase sólida
t – teste estatístico *t*
tab. – tabela
TNF- α - fator de necrose tumoral alfa
 t_r – tempo de retenção
 t_0 – tempo de volume morto
U \cdot mL⁻¹ unidades internacionais por mililitro
UV – ultravioleta
UV-vis – comprimento ultravioleta e visível
V – volts
 V_a - volume de NaOH 0,05 M gasto diretamente com ácidos solúveis em água
 $V_{\text{água}}$ - volume de NaOH 0,05 M gasto com a acidez da água utilizada
var. – variedade
 V_{asa} - volume de NaOH 0,05 M gasto com ácidos solúveis em água obtido pela diferença entre V_a e $V_{\text{água}}$
 V_{atse} - volume de NaOH 0,05 M gasto com ácidos totais solúveis em etanol, obtido pela diferença entre V_b - V_{etanol}
 V_b - volume de NaOH 0,05 M gasto diretamente com ácidos solúveis em etanol
 V_{etanol} - volume de NaOH 0,05 M gasto com a acidez do etanol
 V_p – volume prático
W – largura do pico

SUMÁRIO

Introdução	1
Seção A	3
1 <i>Mucuna pruriens</i> (L.) DC.	3
1.1 Mucuna e seus metabólitos.....	3
1.2 Uso da mucuna como droga	4
1.3 O mal de Parkinson (MP)	5
1.3.1 <i>Tratamento do mal de Parkinson</i>	7
1.3.1.1 Levodopa e farmacocinética.....	7
1.4 Importância terapêutica de compostos fenólicos para o tratamento do MP	10
1.5 Quiralidade e farmacologia.....	11
1.6 Validação de metodologia analítica.....	13
1.7 Processo de secagem por atomização (<i>spray drying</i>).....	14
2 Objetivo geral e específicos.....	16
3 Material e métodos	17
3.1 Validação da metodologia de quantificação de levodopa em mucuna ..	17
3.1.1 <i>Definição do método analítico por CLAE</i>	17
3.1.1.1 Definição do método de separação e adequação do sistema ...	18
3.1.1.2 Definição do método de extração para CLAE.....	18
3.1.2 <i>Curva analítica e linearidade</i>	19
3.1.3 <i>Definição da exatidão do método</i>	19
3.1.4 <i>Definição da precisão do método</i>	20
3.1.5 <i>Definição da robustez do método</i>	21
3.2 Determinação de levodopa em variedades de mucuna	21
3.2.1 <i>Quantificação da levodopa em variedades de mucuna</i>	21
3.2.2 <i>Influência da granulometria no processo de extração para CLAE</i> ...	21
3.3 Obtenção do extrato seco por <i>spray drying</i>	22
3.3.1 <i>Obtenção dos extratos atomizados</i>	22
3.3.2 <i>Determinação do peso seco</i>	23
3.3.3 <i>Quantificação dos extratos antes e depois da atomização</i>	23

3.4	Isolamento de levodopa	24
3.4.1	<i>Análises para identificação da substância EP201</i>	<i>24</i>
3.5	Separação enantiomérica de EP201	25
3.5.1	<i>Otimização da separação dos enantiômeros da dopa e separação de EP201.....</i>	<i>25</i>
3.6	Doseamento de fenólicos totais em mucuna por meio do reativo de Folin-Denis.....	26
3.6.1	<i>Preparo do reativo de Folin-Denis</i>	<i>26</i>
3.6.2	<i>Curva analítica com ácido 3-hidroxicinâmico (3HC) e linearidade...</i>	<i>26</i>
3.6.3	<i>Obtenção do método de extração para o doseamento de fenólicos totais em mucuna.....</i>	<i>27</i>
3.6.4	<i>Doseamento de fenólicos totais por reativo de Folin-Denis.....</i>	<i>27</i>
3.7	Validação da metodologia de quantificação da levodopa em plasma ...	28
3.7.1	<i>Definição da fase móvel e adequação do sistema.....</i>	<i>28</i>
3.7.2	<i>Definição do método de extração para separação em sangue.....</i>	<i>29</i>
3.7.3	<i>Curva analítica da levodopa em plasma e linearidade</i>	<i>30</i>
3.7.4	<i>Definição da exatidão do método</i>	<i>30</i>
3.7.5	<i>Definição da precisão do método</i>	<i>30</i>
3.7.6	<i>Efeito matriz.....</i>	<i>31</i>
3.7.7	<i>Definição da robustez do método</i>	<i>31</i>
3.7.8	<i>Doseamento de levodopa em plasma de animais tratados</i>	<i>31</i>
4	Resultados e discussão	33
4.1	Validação da metodologia de quantificação de levodopa em mucuna ..	33
4.1.1	<i>Definição do método analítico por CLAE</i>	<i>33</i>
4.1.1.1	<i>Definição do método de separação e adequação do sistema ...</i>	<i>33</i>
4.1.1.2	<i>Definição do método de extração para CLAE.....</i>	<i>33</i>
4.1.2	<i>Curva analítica e linearidade</i>	<i>38</i>
4.1.3	<i>Definição da exatidão do método</i>	<i>39</i>
4.1.4	<i>Definição da precisão do método</i>	<i>40</i>
4.1.5	<i>Definição da robustez do método</i>	<i>41</i>
4.2	Determinação dos teores de levodopa em variedades de mucuna.....	45
4.2.1	<i>Doseamento da levodopa em variedades de mucuna.....</i>	<i>45</i>
4.2.2	<i>Influência da granulometria no processo de extração para CLAE...</i>	<i>46</i>

4.3	Obtenção do extrato seco por <i>spray drying</i>	46
4.3.1	Determinação do peso seco	49
4.3.2	Doseamento dos extratos antes e depois da atomização.....	50
4.4	Isolamento de levodopa	52
4.4.1	Análises para identificação da substância ep201	52
4.5	Separação enantiomérica de EP201	64
4.5.1	Otimização da separação dos enantiômeros da dopa.....	64
4.6	Doseamento de fenólicos totais em mucuna por meio do reativo de Folin-Denis.....	73
4.6.1	Curva analítica com ácido 3-hidroxicinâmico (3HC) e linearidade... 73	
4.6.2	Obtenção do método de extração para o doseamento de fenólicos totais em mucuna.....	73
4.6.3	Doseamento de fenólicos totais por reativo de Folin-Denis.....	76
4.7	Validação da metodologia de quantificação da levodopa em plasma ...	78
4.7.1	Definição da fase móvel e adequação do sistema.....	78
4.7.2	Definição do método de extração de levodopa em sangue para quantificação.....	81
4.7.3	Curva analítica da levodopa em plasma e linearidade	82
4.7.4	Definição da exatidão do método	83
4.7.5	Definição da precisão do método	84
4.7.6	Efeito matriz.....	85
4.7.7	Definição da robustez do método	86
4.7.8	Doseamento de levodopa em plasma de animais tratados	91
5	Considerações finais e conclusões	93
	Referências bibliográficas	119
	Seção B	104
1	<i>Boswellia serrata</i> Roxb.	104
1.1	Propriedades químicas e farmacológicas de <i>B. serrata</i> Roxb.....	104
1.2	Quantificação de ácidos boswélicos e validação de método analítico em CLAE	105
1.3	Quantificação de ácidos totais e validação de metodologia	106

2	Objetivo geral e específicos.....	107
3	Material e métodos	108
3.1	Validação da metodologia de quantificação de ácidos boswélicos	108
3.1.1	<i>Definição do método analítico por CLAE.....</i>	<i>108</i>
3.1.1.1	Definição do método de separação e adequação do sistema .	108
3.1.1.2	Definição do método de extração para CLAE.....	109
3.1.2	<i>Curva analítica e linearidade</i>	<i>110</i>
3.1.3	<i>Definição da especificidade do método</i>	<i>110</i>
3.1.4	<i>Avaliação da precisão do método.....</i>	<i>110</i>
3.1.5	<i>Definição da exatidão do método</i>	<i>111</i>
3.1.6	<i>Definição da robustez do método</i>	<i>111</i>
3.2	Determinação dos teores de ácidos boswélicos em resina e em produto acabado.....	112
3.3	Quantificação de ácidos totais em extratos.....	112
3.3.1	<i>Preparação e padronização das soluções.....</i>	<i>112</i>
3.3.1.1	Secagem do biftalato de potássio (padrão primário)	112
3.3.1.2	Padronização da solução de NaOH 0,05 M.....	112
3.3.2	<i>Doseamento dos ácidos orgânicos totais</i>	<i>113</i>
3.3.2.1	Doseamento dos ácidos solúveis em água	113
3.3.2.2	Doseamento dos ácidos totais solúveis em etanol.....	113
3.3.3	<i>Curva analítica e linearidade</i>	<i>114</i>
3.3.4	<i>Avaliação da precisão do método.....</i>	<i>115</i>
3.3.5	<i>Definição da exatidão do método</i>	<i>115</i>
3.3.6	<i>Definição da robustez do método</i>	<i>115</i>
4	Resultados e discussão	117
4.1	Validação da metodologia de quantificação de ácidos boswélicos	117
4.1.1	<i>Definição do método analítico por CLAE.....</i>	<i>117</i>
4.1.1.1	Definição do método de separação e adequação do sistema .	117
4.1.1.2	Definição do método de extração para CLAE.....	118
4.1.2	<i>Curva analítica e linearidade</i>	<i>118</i>
4.1.3	<i>Definição da especificidade do método</i>	<i>119</i>
4.1.4	<i>Avaliação da precisão do método.....</i>	<i>119</i>
4.1.5	<i>Definição da exatidão do método</i>	<i>120</i>

4.1.6	<i>Definição da robustez do método</i>	121
4.2	Determinação dos teores de ácidos boswélícos em resina e em produto acabado.....	122
4.3	Quantificação de ácidos totais em extratos.....	123
4.3.1.1	Padronização da solução de NaOH 0,05 M.....	123
4.3.2	<i>Doseamento dos ácidos orgânicos totais</i>	124
4.3.2.1	Doseamento dos ácidos solúveis em água	124
4.3.2.2	Doseamento dos ácidos totais solúveis em etanol.....	125
4.3.3	<i>Curva analítica e linearidade</i>	126
4.3.4	<i>Avaliação da precisão do método</i>	126
4.3.5	<i>Definição da exatidão do método</i>	127
4.3.6	<i>Definição da robustez do método</i>	128
5	Conclusão	129
	Referências bibliográficas	130

Introdução

As plantas são entidades complexas, com grande diversidade de metabólitos. Para que se garanta a segurança e eficácia das drogas vegetais, faz-se necessário o uso de metodologias que identifiquem e quantifiquem algumas dessas substâncias, sejam elas marcadores analíticos ou ativos. Uma ferramenta útil nesse caso é a cromatografia líquida de alta eficiência. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária exige dos fabricantes os métodos validados para o controle de qualidade no registro de produtos, demonstrando assim que são adequados para a finalidade pretendida. Nesse sentido, este trabalho teve como objetivo desenvolver métodos de controle de qualidade para duas espécies: *Mucuna pruriens* (L.) DC., Fabaceae e *Boswellia serrata* Roxb., Burseraceae, além do desenvolvimento de um extrato padronizado de *M. pruriens*, visto que para essas plantas não foram encontradas metodologias analíticas validadas para seu controle de qualidade.

A espécie *M. pruriens* é utilizada na Índia para tratamento do mal de Parkinson. O mal de Parkinson (MP) é uma doença neurodegenerativa que afeta uma porção significativa da população. Seu tratamento clínico é sintomático pois consiste na reposição da dopamina produzida em quantidade insuficiente no sistema nervoso central dos pacientes. O principal fármaco para o controle da doença é a levodopa, a qual é convertida em dopamina no cérebro. Sendo um medicamento de uso continuado, apresenta grande impacto econômico sobre pacientes de baixa renda e por isso são comuns os relatos de falta de aderência ao tratamento por este motivo. O uso de uma fonte natural de levodopa, como a mucuna, contribuiria para a redução de custos para o paciente e serviços públicos de saúde. A mucuna é disponível no Paraná, mas é utilizada como adubo verde.

A *B. serrata* é usada na Índia para tratamento de inflamações. Os fármacos mais utilizados para o tratamento de doenças inflamatórias são inibidores de ciclooxigenase (COX-1 e COX-2), antagonistas de leucotrieno e inibidores de lipoxigenase. Os inibidores de 5-lipoxigenase (5-LO), enzima chave da biossíntese de leucotrienos (LT), são objetos de várias pesquisas. Inibidores de 5-LO foram encontrados na resina de espécies do gênero *Boswellia*. A medicina Ayurvédica utiliza as resinas do gênero *Boswellia* em doenças inflamatórias. A resina comercializada para fins farmacêuticos pode vir de várias espécies do gênero *Boswellia*, além de outras resinas de plantas. Nesse caso, seria imprescindível o

desenvolvimento do método, com a definição de marcadores para o controle de qualidade para a matéria-prima e o produto acabado.

Seção A

1 *Mucuna pruriens* (L.) DC.

1.1 *Mucuna e seus metabólitos*

A literatura científica mostra que alguns vegetais produzem levodopa e o primeiro relato foi em *Vicia faba* em 1920 [1]. Em *Mucuna pruriens* (L.) DC. foi verificada a presença de levodopa em 1937 [2]. Desde o isolamento de dopa de *Vicia faba* [3], o composto tem sido relatado em leguminosas como *Baptisia*, *Lupinus*, *Mucuna* e *Vicia* em valores acima de 1,9% [4]. Em análise de mais de 1000 espécies dentre 135 famílias, o gênero *Mucuna* foi considerado a melhor fonte de levodopa em sementes para uso comercial [4]. O conteúdo de levodopa em caules e folhas é maior do que o das raízes nos primeiros dias de germinação de *M. pruriens*, mas todos decrescem consideravelmente após o 10º dia de germinação, sugerindo que as sementes são a única fonte economicamente possível de levodopa [5]. Há estudos de melhoramento da produção de levodopa por via biotecnológica por seleção de células de cultura de *M. pruriens* [6]. A levodopa também é chamada de 3-hidroxi-L-tirosina, ácido (S)-2-amino-3-(3,4-diidroxifenil) propanóico ou (-)-3-(3,4-diidroxifenil)-L-alanina.

Do caule de *M. cinerea* foram isoladas as substâncias β -sitosterol, daucosterol (β -sitosterol glicosilado), estigmasterol, estigmasterol glicosilado, ácidos graxos e ésteres, medicarpina, asperglaucídeo, prunetina e genisteína. Essa espécie apresentou atividade nematicida contra fitonematóides [7]. Compostos catecólicos foram isolados, como tetraidroisoquinolinas em espécies de *Mucuna*, como a L-3-carboxi-6,7-diidroxil-1,2,3,4-tetraidroisoquinolina (em sementes de *M. mutisiana*) [8] e a 3-carboxi-6,7-diidroxil-1-metil-1,2,3,4-tetraisoquinolina (em sementes de *M. deeringiana*) [9] (fig.1).

Além de levodopa, outros compostos foram encontrados em folhas de *M. pruriens*, como derivados indol-3-alquilamínicos N,N-dimetiltriptamina, 5-metóxi-N,N-dimetiltriptamina, bufotenina, colina e serotonina (essa última dos tricomas da vagem) [10]. Algumas tetraidroisoquinolinas foram isoladas de *M. pruriens*, como a L-3-carboxi-6,7-diidroxil-1,2,3,4-tetraidroisoquinolina e a 1-metil-3-carboxi-6,7-diidroxil-1,2,3,4-tetraidro-isoquinolina. Essas tetraidroisoquinolinas são estruturalmente

semelhantes a outras usadas atualmente para reduzir a pressão arterial, mas não foram encontrados estudos sobre essa possível utilização farmacológica [11]. Outras tetraidroisoquinolinas foram isoladas de sementes de *M. pruriens*, sendo as L-3-carboxi-6,7-diidroxi-1,2,3,4-tetraidroisoquinolina, (-)-3-carboxi-6,7-diidroxi-1-metil-1,2,3,4-tetraidroisoquinolina, (-)-3-carboxi-1,1-dimetil-6,7-diidroxi-1,2,3,4-tetraidroisoquinolina e (-)-3-carboxi-1,1-dimetil-7,8-diidroxi-1,2,3,4-tetraidroisoquinolina [12]. Algumas estruturas de substâncias estão representadas na fig. 1.

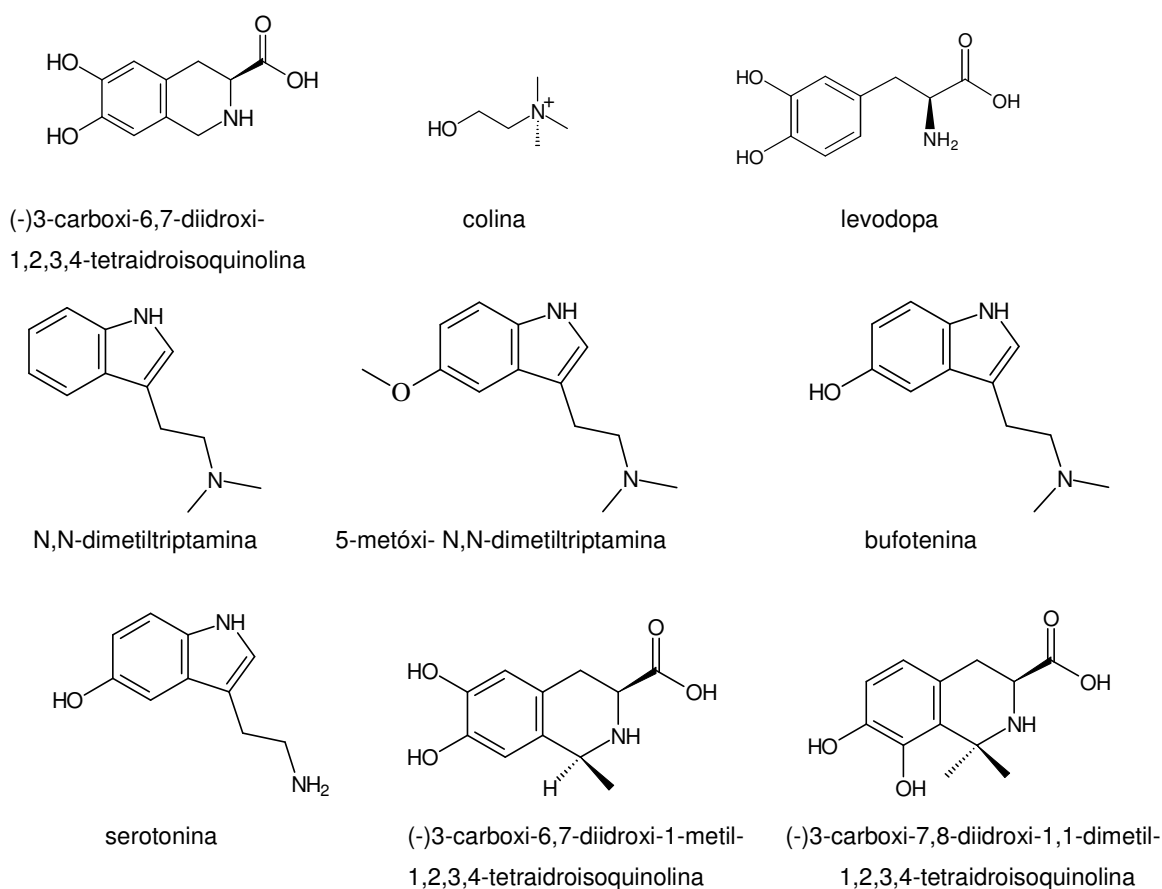


FIGURA 1 – ESTRUTURAS DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DA ESPÉCIE *Mucuna pruriens* (L.) DC.

1.2 Uso da *Mucuna* como droga

Algumas espécies desse gênero são utilizadas há muito tempo para o tratamento de doenças neurológicas, principalmente para o Mal de Parkinson (MP). Os primeiros relatos constam do sistema de medicina tradicional da Índia (*Ayurveda*) [13][14]. Testes clínicos iniciais indicaram a utilidade da espécie *M. pruriens* para esse fim [15] e sua eficácia foi confirmada [13]. Outro estudo em modelo animal

concluiu que o uso da semente dessa espécie é mais eficaz do que a levodopa com carbidopa, sugerindo a presença na planta de outros compostos com efeito benéfico [16] e, comparada à levodopa pura foi, dose a dose, duas vezes mais eficiente [17]. Uma formulação farmacêutica foi desenvolvida a partir da semente de *M. pruriens*, denominada HP-200 e foi submetida a estudos de toxicidade em animais em curto (duas semanas) e longo prazo (52 semanas). Em testes de observação fisiológica e comportamental, contagem de sangue total, análise química do sangue e urina e exame de tecidos, nenhum efeito adverso foi notado com o uso de HP-200 [17]. Esse medicamento contém aproximadamente 4% de L-dopa e parece ser adequado ao tratamento de MP [18], sendo estável por três anos a 37 °C. Um estudo clínico testou o HP-200 em pacientes com MP e a melhora foi significativa, não tendo efeitos adversos para os parâmetros clínicos ou laboratoriais [17]. Outro estudo em pacientes com MP usou extrato de sementes de *M. pruriens* e comparou aos efeitos da levodopa (com carbidopa) e do placebo; os resultados de farmacocinética indicaram que a formulação contendo *M. pruriens* teve rápido início de ação e longo tempo de ação, sem aumento de discinesia, sugerindo que a *M. pruriens* possui vantagens, comparada ao tratamento convencional de MP [19].

As sementes da mucuna tem sido indicadas para uso como alimento. O uso de mucuna para consumo humano parece seguro, pois ela tem sido proposta, por exemplo, na formulação de biscoitos [20][21]. O teor de levodopa nos biscoitos provavelmente é insignificante visto que ela se degrada entre 70 e 100 °C [11].

Pesquisas recentes comprovaram o uso de *M. pruriens* contra o veneno de serpentes por via imunológica. Provavelmente o mecanismo consta de imunização por proteínas de *M. pruriens*; os anticorpos produzidos pelo contato com as proteínas da planta reagem com as proteínas do veneno de *Echis carinatus* [22]; uma das proteínas é uma glicoproteína multiforma do tipo N-glicana [23]. Outra atividade relatada com as sementes de *M. pruriens* foi a atividade hipoglicemiante em ratos normais e ratos diabéticos (por estreptozotocina) – a diminuição nos níveis de glucose foi semelhante à diminuição propiciada por tolbutamida, um medicamento hipoglicêmico [24].

1.3 O Mal de Parkinson (MP)

O parkinsonismo é uma síndrome clínica que compreende quatro características principais: bradicinesia (lentidão e diminuição dos movimentos), rigidez muscular, tremor (geralmente em movimentos voluntários) e prejuízo do equilíbrio postural, com distúrbios na locomoção e queda. O parkinsonismo mais comum é o MP idiopático, descrito por James Parkinson em 1817 como “*paralysis agitans*” ou “paralisia agitada”. A evidência patológica de MP é a perda dos neurônios dopaminérgicos, pigmentados da substância negra, com o aparecimento de inclusões intracelulares conhecidas como corpos de Lewy [25], além do neurotransmissor dopamina estar marcadamente diminuído nos gânglios basais [26]. A perda progressiva de neurônios dopaminérgicos é normal em decorrência da idade, mas a maioria das pessoas não perde 80 a 90% dos neurônios dopaminérgicos, que é necessária para causar os sintomas de MP. Sem tratamento, o progresso da doença em cinco a dez anos leva a um estado rígido, acinético, impedindo os pacientes de cuidarem de si próprios. A morte é freqüentemente resultado de imobilidade, incluindo embolia pulmonar.

O corpo estriado, no Sistema Nervoso Central, é muito rico em acetilcolina e em dopamina. A acetilcolina tem efeitos excitatórios, enquanto que a dopamina é principalmente inibitória, e tem sido sugerido que os sintomas do MP resultam de um desequilíbrio entre esses dois sistemas. O tratamento medicamentoso visa restaurar esse equilíbrio. A disponibilidade de tratamento farmacológico efetivo alterou radicalmente o prognóstico de MP. Na maioria dos casos, boa mobilidade funcional pode ser mantida durante muitos anos e a expectativa de vida de pacientes tratados aumentou significativamente [25][27].

Há indícios de que pacientes com MP apresentam estresse oxidativo aumentado. Níveis aumentados de ferro e peroxidação lipídica, combinados com baixos níveis de glutatona e baixa atividade de superóxido dismutase estão presentes na substância negra de pacientes com MP. Os neurônios dopaminérgicos são submetidos a estresse oxidativo porque o metabolismo de catecolaminas é oxidativo – a atividade deficiente nos complexos enzimáticos de transporte de elétrons pode levar os elétrons a se ligarem ao oxigênio, gerando radicais livres. Estudos afirmam que há uma relação inversamente proporcional entre a ingestão de β -caroteno e ácido ascórbico e o desenvolvimento de MP. Isso sugere que os antioxidantes possam colaborar para o tratamento da doença [28].

1.3.1 Tratamento do Mal de Parkinson

As drogas eficazes no tratamento de MP estão nas seguintes categorias:

- Substitutos de dopamina (levodopa) usados com inibidores de dopa-descarboxilase de ação periférica (carbidopa, benzerazida);
- Imitadores da ação de dopamina (bromocriptina, pergolida, lisurida);
- Fármacos que aumentam a liberação de dopamina e podem ser neuroprotetores;
- Inibidores da MAO-B - monoaminoxidase (ex.: selegilina);
- Drogas que liberam dopamina (ex.: amantadina)
- Antagonistas da acetilcolina (ex.: benztropina) [27].

1.3.1.1 Levodopa e farmacocinética

A dopa apresenta dois enantiômeros: a L-dopa (ácido (S)-2-amino-3-(3,4-diidroxifenil) propanóico) e a D-dopa (ácido (R)-2-amino-3-(3,4-diidroxifenil) propanóico) (fig. 2). A levodopa, também chamada 3-hidroxi-L-tirosina ou (-)-3-(3,4-diidroxifenil)-L-alanina, é precursora da dopamina. Atualmente é considerada, junto com um inibidor de dopa-descarboxilase, o tratamento de primeira linha para MP. É absorvida rapidamente no intestino delgado mediante um sistema de transporte ativo de aminoácidos aromáticos, especificamente o transportador de fenilalanina. A absorção da levodopa pode ser diminuída pela competição com a absorção de alimentos ricos em aminoácidos, bem como depende da quantidade de alimento no sistema digestório, pH do suco gástrico e o tempo que o fármaco fica exposto à degradação por enzimas da mucosa gástrica e intestinal. A penetração do fármaco droga no sistema nervoso central (SNC), cruzando a barreira hematoencefálica também é um processo ativo mediado por um carreador de aminoácidos aromáticos, e competição entre proteínas da dieta e a levodopa pode ocorrer nesse nível. Utiliza-se levodopa para o tratamento de MP visto que essa atravessa a barreira hematoencefálica e a dopamina não; provavelmente a levodopa é convertida em dopamina no cérebro [25][27][29]. Alguns autores sugerem que a dieta rica de proteínas interfira no resultado clínico da levodopa, por um mecanismo que não seja a competição da levodopa e aminoácidos da alimentação pela absorção intestinal. A

cinética da levodopa no plasma não é notavelmente modificada durante o progresso de MP, sugerindo que o fator limitante da absorção do fármaco deve ser a barreira hemato-encefálica. Portanto, os efeitos da dieta protéica na biodisponibilidade da levodopa dependem mais da competição dos aminoácidos da alimentação no sistema transporte na barreira hematoencefálica [30].

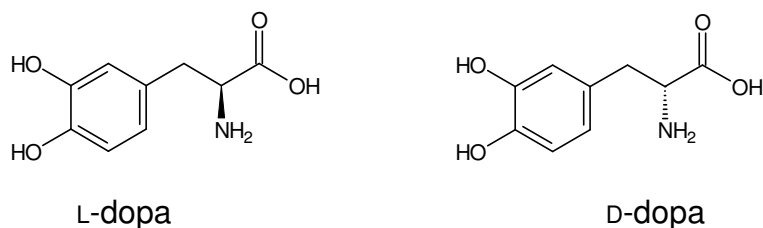


FIGURA 2 - ENANTIÔMEROS DA DOPA

A levodopa passa por intenso metabolismo de primeira passagem no sistema digestório, sendo principalmente metabolizada por uma enzima L-aminoácido aromático descarboxilase (dopa descarboxilase – DDC) à dopamina. Como o substrato para essa enzima deve ser um L-isômero, a D-dopa não é metabolizada por essa via [31]. A levodopa pode sofrer também o ataque da catecol-orto-metil-transferase (COMT), convertendo-a em 3-O-metil-dopa (3OMD) [25][27][31]. A COMT precisa de Mg^{2+} e S-adenosilmetionina como doador de grupo metil para o processo de metilação, convertendo a S-adenosilmetionina para S-adenosilhomocisteína e à subsequente homocisteína [32]. A dopamina gerada é rapidamente desaminada por um tipo de monoaminoxidase (MAO) em ácido 3,4-diidroxifenilacético (DOPAC), que é metilado pela COMT originando o ácido homovanílico (HVA) (fig. 3). A enzima MAO atua na parede do intestino e a COMT no sangue e tecidos periféricos, enquanto que a DDC atua em ambos os locais [25][31], retirando aproximadamente 99% da levodopa administrada via oral [27].

A resposta clínica do uso oral da levodopa é variável e imprevisível por causa da absorção errática e do metabolismo de primeira passagem, resultando em flutuações de dose. A biodisponibilidade baixa é resultado, portanto, da intensa metabolização de primeira passagem, absorção em sítios específicos do intestino por sistema transporte de aminoácidos. Acredita-se que a maior parte dos efeitos secundários resultantes da administração oral de levodopa seja devido à formação de grandes quantidades de dopamina durante o metabolismo de primeira passagem

no trato gastrointestinal. Esses efeitos incluem náusea, vômito e irregularidade cardíaca. A associação de inibidores de DDC aumentam a biodisponibilidade da levodopa, diminuindo a dose terapêutica necessária da mesma e minimizam os efeitos secundários periféricos [34].

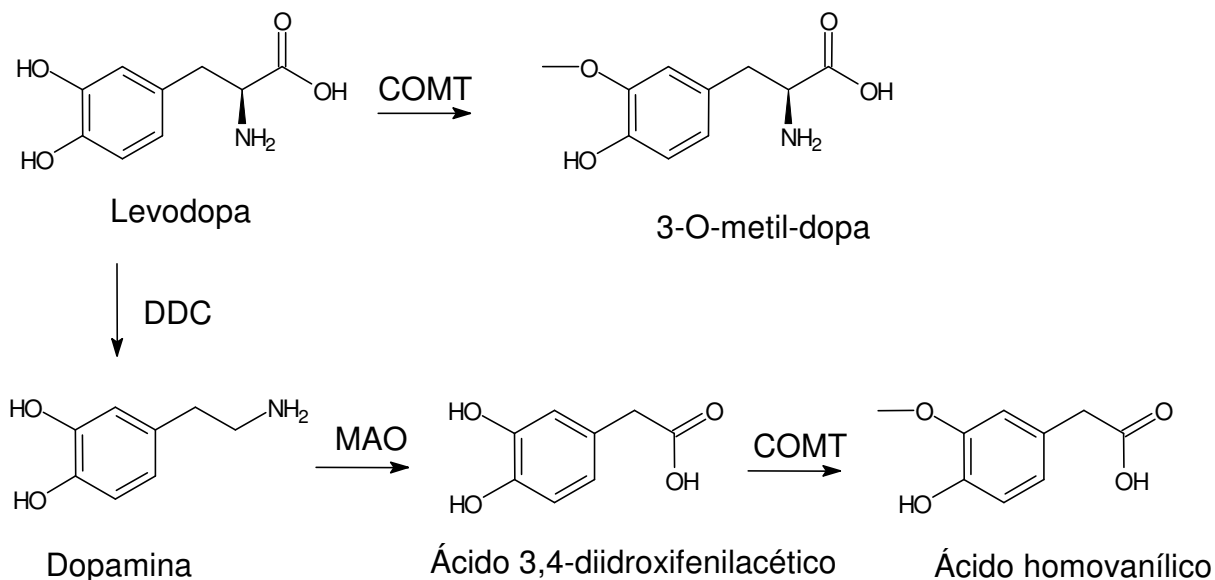


FIGURA 3 – ESQUEMA DA METABOLIZAÇÃO DA LEVODOPA EM HUMANOS

Legenda: COMT – catecol orto-metil-transferase; DDC – dopa descarboxilase; MAO – monoaminooxidase

A levodopa distribui-se na maioria dos tecidos corporais (inclusive sendo metabolizada no sangue e em tecidos periféricos), porém não no SNC, que recebe menos de 1% da dose devido ao metabolismo intenso da periferia, visto que a DDC é difusa nos tecidos. O pequeno percentual de cada dose que atravessa a barreira hematoencefálica se descarboxila em dopamina, porque a DDC não se encontra nos neurônios. A dopamina estimula os receptores dopaminérgicos nos gânglios basais e melhora o equilíbrio entre a atividade colinérgica e a dopaminérgica, com melhoria da modulação dos impulsos nervosos transmitidos ao córtex motor. Sabe-se que o efeito antiparkinsoniano do fármaco depende da formação de dopamina no cérebro porque inibidores de DDC que penetram no cérebro impedem seu efeito [25][27][35].

Existem outras formas farmacêuticas que visam diminuir a flutuação de dose de levodopa. Há o desenvolvimento de formas farmacêuticas de administração oral com comprimidos para liberação controlada [36], comprimidos revestidos de liberação entérica, administração retal e administração nasal utilizando pró-fármacos

solúveis em água [34], absorção transdermal com fibras de troca iônica ou com hidrogel [37]. O desenvolvimento de co-fármacos também está presente, ou seja, na mesma molécula há a hibridação molecular de dois fármacos diferentes; nesse caso são usados a levodopa mais entacapone, um inibidor de COMT [38].

1.4 Importância terapêutica de compostos fenólicos para o tratamento do MP

As substâncias fenólicas advêm do metabolismo especial nas plantas e muitas tem grande ação antioxidante. Elas podem auxiliar no tratamento de doenças com mecanismo oxidativo, como é o caso do MP. Entre as substâncias fenólicas têm-se os ácidos, taninos, ligninas, flavonóides, além de proteínas e alcalóides.

O gênero *Mucuna* possui outras substâncias fenólicas, além da levodopa, que podem auxiliar no tratamento de MP. Uma dessas substâncias é a L-3-carboxi-6,7-diidroxi-1,2,3,4-tetraidroisoquinolina [8], além de outras tetraidroisoquinolinas isoladas de *M. pruriens* [12]. Algumas tetraidroisoquinolinas podem ter efeito benéfico em MP por se envolverem no mecanismo oxidativo da doença. Estudos indicam que a 1-metil-1,2,3,4-tetraidroisoquinolina previne anormalidades comportamentais induzidas por 1-metil-4-fenil-1,2,3,4-tetraidropiridina (MPTP), 1,2,3,4-tetraidroisoquinolina ou 1-benzil-1,2,3,4-tetraidroisoquinolina (fig. 4). O produto de metabolização da 1,2,3,4-tetraidroisoquinolina degenera os neurônios dopaminérgicos do estriado em modelos animais e a 1-benzil-1,2,3,4-tetraidroisoquinolina é uma neurotoxina que causa MP em humanos [39]. A MPTP é usada em ensaios farmacológicos *in vivo* para a geração do modelo experimental de MP.

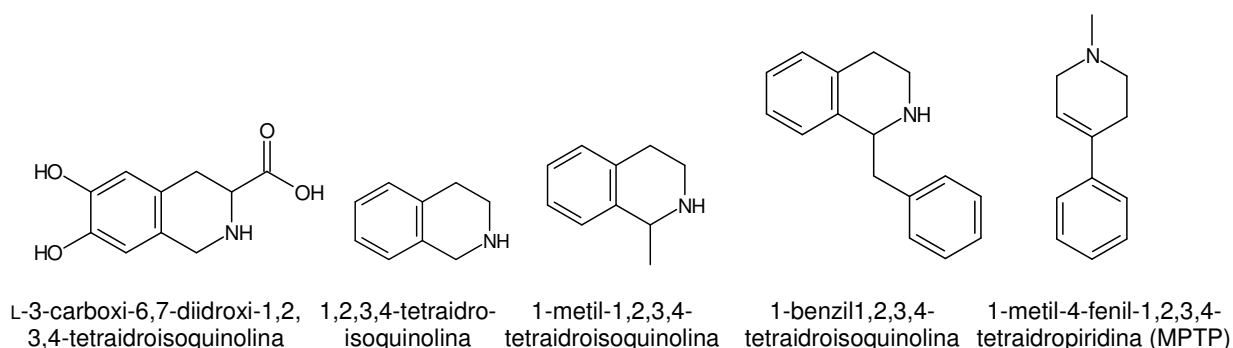


FIGURA 4 - ESTRUTURAS DE ALGUMAS TETRAIDROISOQUINOLINAS E MPTP

Parte dos efeitos benéficos da *M. pruriens* sobre MP pode ser atribuída às

isoflavonas. Um estudo *in vitro* demonstrou que o extrato alcoólico de sementes de *M. pruriens* inibiu a geração de peróxidos e peroxidação lipídica; já estudos *in vivo* mostraram inibição na peroxidação lipídica – o extrato teve ação antioxidante, sem toxicidade e não induziu peroxidação [40]. As isoflavonas genisteína, orobol, psitectorigenina, 8-hidroxigenisteína e 3',4',5,7-tetraidroxi-8-metoxi-isoflavona inibiram a COMT em fungos; já a DDC foi inibida por genisteína e orobol [41] (fig. 5). O extrato etanólico do caule de *M. cinerea* contém as isoflavonas prunetina e genisteína [7] (fig. 5) enquanto que, para a *M. pruriens*, nenhuma isoflavona foi isolada ainda.

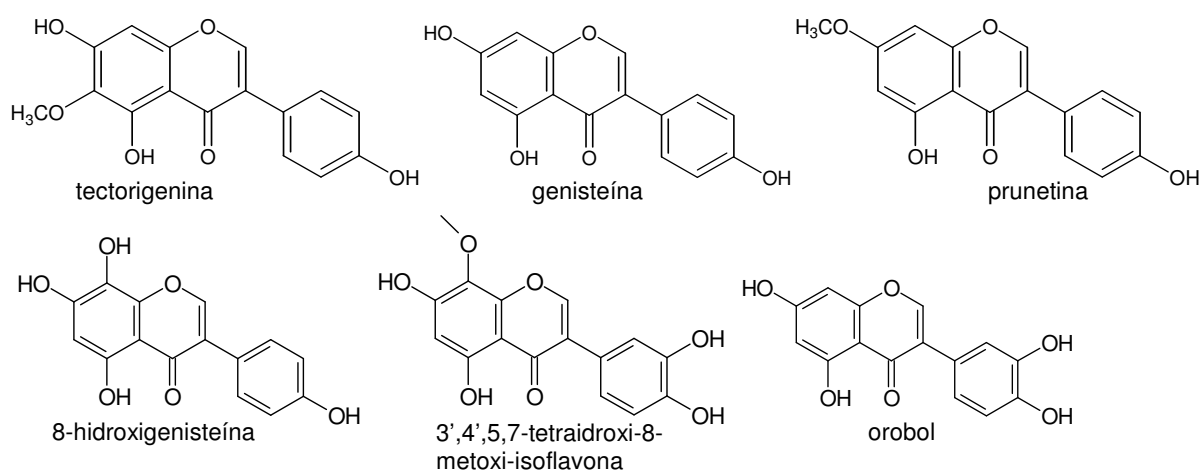


FIGURA 5 - ESTRUTURAS DE ALGUMAS ISOFLAVONAS

1.5 Quiralidade e farmacologia

O processo farmacodinâmico depende das interações entre fármaco e receptor. A estrutura do fármaco influencia diretamente nessa ação: fármacos com estereocentros podem apresentar metabolização diferenciada ou efeitos farmacológicos distintos. Por isso, o estudo de substâncias enantioméricas é de muita importância, visto que essas substâncias podem ter diferentes propriedades farmacológicas e toxicológicas. O enantiômero que possui a atividade farmacológica desejada é chamado de “eutômero” e o outro, chamado “distômero”, normalmente é inativo ou eventualmente tóxico [42].

Uma área muito importante na pesquisa de medicamentos, a farmacovigilância (que estuda as reações ao fármaco percebidas após a comercialização), nasceu após o desastre da talidomida. A partir de 1957, a mistura dos enantiômeros da talidomida era usada como sedativo e agente antináuseas,

principalmente para o enjôo matinal em mulheres grávidas. Todavia, descobriu-se que o enantiômero (*S*) apresentava ação teratogênica, enquanto que seu antípoda era desprovido dessa ação. Posteriormente, verificou-se que o isômero (*S*) detinha propriedades antiinflamatórias, principalmente na redução da dor e do processo inflamatório associado ao leproma (por inibição da produção de $\text{TNF-}\alpha$). Além disso, percebeu-se que, *in vivo*, ocorre rápida epimerização da talidomida em plasma humano, após administração por via oral das espécies enantiomericamente puras, ou seja, mesmo que a talidomida fosse empregada na forma enantiomericamente pura, a tragédia em 1960 não seria evitada [43]. Com a divulgação de casos como esse, aumentou-se o interesse no estudo de medicamentos contendo enantiômeros, tanto em alterações farmacodinâmicas (reação com receptor) ou farmacocinéticas (absorção, distribuição, metabolização e excreção).

A dextrodopa (*D*-dopa ou (*R*)-dopa) desencadeia algumas reações adversas como discinesia e granulocitopenia [42][44]. Alguns trabalhos relatam que a *D*-dopa produziu efeito similar ao alcançado pela *L*-dopa na mudança de comportamento em ratos lesionados unilateralmente no estriado, com potência de um décimo da obtida com a *L*-dopa. A *D*-dopa sofre inversão da estereoquímica unidirecional no organismo e sugere-se que a *D*-dopa seja desaminada por processo oxidativo a um α -ceto-ácido correspondente por uma *D*-aminoácido oxidase e depois transaminada pela dopa transaminase para *L*-dopa [45]. Todavia, os efeitos indesejáveis são mais preponderantes com a *D*-dopa, por isso a necessidade do medicamento apresentar somente a *L*-dopa.

Para a separação de estereoisômeros, podem ser utilizados métodos que apliquem derivatizações das moléculas a serem analisadas. Entretanto, a instabilidade do derivado, interferências dos reagentes na formação de reações e produtos indesejáveis, incapacidade de alguns reagentes em derivatizar alguns tipos de moléculas como as que contêm grupo amino secundário, inadequada pureza enantiomérica de alguns reagentes e longo tempo para a preparação são as principais desvantagens dos métodos de derivatização [46]. Por isso, métodos que utilizem variação em fase estacionária são preferíveis.

Vários trabalhos já relataram a separação de estereoisômeros da dopa com diferentes tipos de fase estacionária por CLAE: com produtos cristalinos de degradação da vancomicina (antibiótico macrocíclico) [47]; com teicoplanina (antibiótico glicopeptídico) [46][48]; com Cu (II) – aspartame [49] ou Cu (II) – *L*-

fenilalanina [45]; N,N,N',N'-tetrametil-(*R*)-propano-1,2-diamina com íon metálico [50] (cromatografia de troca com ligante enantiosseletivo); com fase polissacarídica [51]; e com anticorpos ligados covalentemente a uma matriz de agarose [52]. Já com fase estacionária contendo éter de coroa, tem-se vários métodos de separação, como a eletroforese capilar [42][53] e CLAE [53]-[57].

1.6 Validação de metodologia analítica

As Farmacopéias apresentam metodologia analítica para a levodopa e para produtos que a contenham [58][59]. Entretanto não foi encontrada metodologia analítica validada para a mensuração de levodopa em *M. pruriens*. A partir da RDC nº 48 (de 16/03/2004) a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) exige dos fabricantes os métodos para o controle de qualidade no registro de produtos [60]. O método escolhido deve ser validado para demonstrar que é apropriado para a finalidade pretendida. A validação é orientação da *International Conference of Harmonisation* (ICH) para testes quantitativos de fármacos em matérias-primas, medicamentos ou componentes do produto farmacêutico [61][62]. Métodos analíticos são considerados validados se descritos em farmacopéias ou formulários oficiais, reconhecidos pela ANVISA; caso não o sejam, devem seguir o recomendado pela legislação [63]. Para a validação de testes quantitativos para determinar o princípio ativo, marcador ativo ou marcador analítico [64] em produtos farmacêuticos ou matérias-primas (categoria I), o método deve apresentar os requisitos de: especificidade e seletividade; linearidade; intervalo (limites superior e inferior); precisão; exatidão; e robustez [62][63].

Para que o processo de validação analítica por CLAE seja alcançado, alguns parâmetros de avaliação cromatográfica devem ser obtidos:

- Tempo de retenção – t_r – tempo no qual o analito leva para ser cromatografado e ser detectado;
- Tempo de volume morto - T_0 – tempo no qual o solvente leva para chegar até o detector
- Largura do pico – W – tempo no qual a substância tem o início de sua detecção até imediatamente não ser mais detectada;
- Fator capacidade - K' - medida relativa do tempo de retenção, dado por:

$$K' = (t_r - t_0) / t_0;$$

- Fator de separação – medida entre dois picos adjacentes, dado por: K'_2/K'_1 ;
- Resolução - R – medida de separação, é a razão entre o dobro da diferença entre os tempos de retenção de picos adjacentes sobre a soma das larguras dos mesmos picos, dado por: $R = 2 (t_2 - t_1) / (W_1 + W_2)$;
- Número de Pratos teóricos - medida de separação, fornecida por: $N = 16(t_r/W)^2$;
- Caudamento a 5% - $T_{5\%}$ - medida de assimetria do pico, avalia o caudamento assimétrico a 5% da altura total do pico.

1.7 Processo de secagem por atomização (spray drying)

Uma das formas de secagem de extratos para obtenção de extratos secos para utilização medicamentosa é a definida como secagem por atomização ou *spray drying*. O termo atomização, relacionado a *spray drying*, deve-se à divisão do líquido em milhões de partículas formando uma nuvem ou *spray*. É um processo de remoção de umidade de um material por evaporação, através dos processos de transferência de calor e massa [65]. O processo de atomização rapidamente seca soluções ou misturas particuladas por atomização do líquido em uma câmara aquecida. Geralmente, a mistura é pré-concentrada, atomizada na forma de aerossol, sendo as microgotas secadas em uma corrente de gás seco e quente, geralmente ar. As partículas são separadas do gás por densidade, resfriadas e acondicionadas [66].

A secagem de um m³ de líquido origina aproximadamente 2.10¹² partículas uniformes, com diâmetro de 100 µm, equivalente a uma área superficial de 60.000 m². No contato *spray*-ar, as partículas encontram o ar quente ocorrendo rápida evaporação. O controle da umidade ocorre por meio da regulação do processo, como o fluxo e a temperatura [65]. A secagem por atomização é usada na indústria alimentícia para produção de leite em pó, proteínas de soja, café e chá solúvel, entre outros produtos.

O equipamento de *spray dryer* mais comum (fig. 6) contém o coletor de pó do tipo ciclone, onde o pó seco é separado do gás de secagem por força centrífuga

[67]. Ciclones são usados para limpeza de gases industriais, separando sólidos de gases e são os coletores de sólidos industriais mais comuns [68].

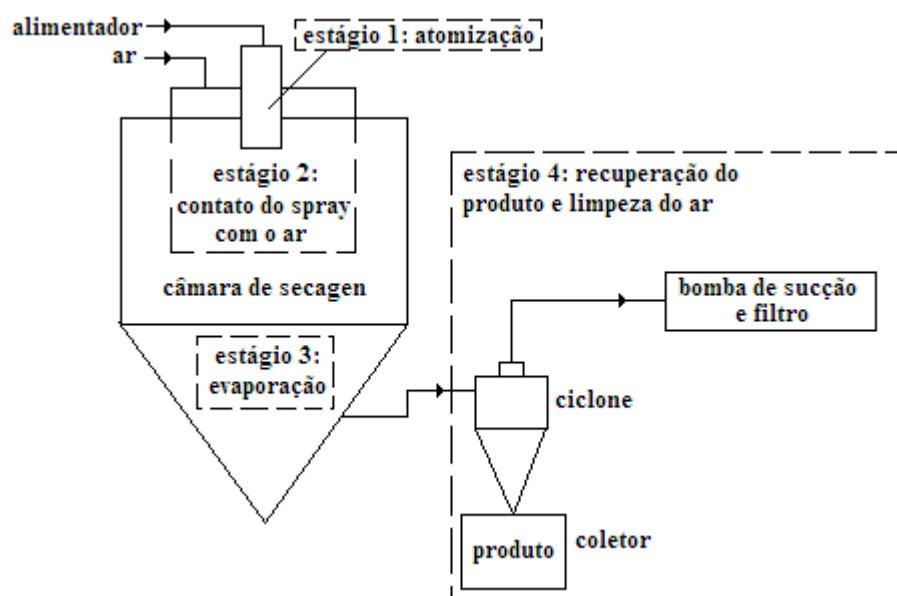


FIGURA 6 - ESQUEMA DE UM EQUIPAMENTO DE *SPRAY DRYER*

Fonte: Adaptado de LEITE (2001) [65]

2 Objetivo geral e específicos

Geral:

- Preparar extrato seco de *Mucuna* sp., padronizado em levodopa.

Específicos:

- Obter variedades de sementes de *Mucuna* sp. e quantificar o teor de levodopa por meio de método validado por CLAE;
- Preparar extrato seco atomizado e padronizado em levodopa em pequena escala para a produção de um medicamento fitoterápico;
- Isolar e caracterizar levodopa de *Mucuna* sp.;
- Verificar a pureza enantiomérica da levodopa isolada de *Mucuna* sp. por meio de metodologia analítica via CLAE com coluna quiral;
- Desenvolver um método de preparo de amostra para doseamento de fenólicos totais em mucuna por reativo de Folin-Denis usando espectrofotometria via UV;
- Desenvolver metodologia analítica por CLAE para separação de levodopa em plasma.

3 Material e métodos

Material Vegetal

Foram utilizados pós das sementes de mucuna preta (*Mucuna pruriens* var. preta), mucuna cinza (*Mucuna pruriens* var. cinza), mucuna verde (*Mucuna pruriens* var. verde). As sementes foram fornecidas pelo IAPAR (Londrina), de forma seca, e os pós foram obtidos por moagem em laboratório e em escala piloto na empresa Steviafarma Industrial.

Tratamento dos dados

Os dados foram apresentados na forma de intervalo de confiança (com limite de confiança a 99%) além dos cálculos de desvio padrão (DP) e desvio padrão relativo (DPR%). Os testes estatísticos utilizados foram: teste de rejeição Q; teste *t* ($\alpha = 0,05$) para comparação entre duas médias; teste *F* (ANOVA) para comparação de médias ($\alpha = 0,05$) [69][70]. Para a obtenção dos resultados de planejamento fatorial, trabalhou-se com planilhas especiais de quimiometria (matrizes de combinações) gratuitas [71] além do programa Minitab 15 (Minitab Inc.), para a obtenção de gráfico normal dos efeitos, gráfico dos efeitos principais e de interação.

3.1 Validação da metodologia de quantificação de levodopa em mucuna

A validação da metodologia seguiu os parâmetros estipulados pela legislação brasileira vigente - Guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos (Resolução RE n° 899, de 29 de maio de 2003) [63], bem como os parâmetros internacionais, além de indicativos em livros e artigos [61][62][72]-[76].

3.1.1 Definição do método analítico por CLAE

Usou-se cromatógrafo líquido de alta eficiência, marca Varian®, com bomba quaternária modelo 9012, injetor automático modelo AI200, alça de 20 μ L e detector

DAD, modelo 9065 Varian[®]. A aquisição dos dados foi obtida por software Star LC Workstation[®] versão 6.0. A fase estacionária foi uma coluna Varian Res Elut C₁₈, 5 µm, tamanho de poro de 90 Å, 150 mm x 4,6 mm de diâmetro interno, de aço inoxidável. Utilizou-se coluna guarda de C₁₈, 5 µm, tamanho de poro 90 Å, 10 mm x 4,6 mm de diâmetro interno.

3.1.1.1 Definição do método de separação e adequação do sistema

A água ultrapura, utilizado para essa separação cromatográfica, foi obtida por meio de água bidestilada, purificada por sistema MiliQ - Millipore[®], sendo posteriormente acidificada até pH 3 com H₃PO₄ grau analítico (marca Synth) até pH 3, sendo a solução posteriormente filtrada sob pressão reduzida através de membrana HV (Durapore) em PVDF (fluoreto de polivinilideno), marca Milipore[®] com 0,45 µm de tamanho de poro. O metanol usado foi da marca Merck, grau CLAE. O comprimento de onda para a detecção foi de 282 nm, com fase móvel a 20% de metanol em água ultrapura acidificada, em modo isocrático por 5 min, fluxo de 1 mL.min⁻¹ a 25 °C. Confirmou-se a identidade do pico por comparação dos espectros em UV e co-eluição com padrão. Na adequação do sistema, verificou-se o fator capacidade (K'), resolução (R), número de pratos teóricos (N) e caudamento do pico a 5% (T_{5%}).

3.1.1.2 Definição do método de extração para CLAE

Diferentes quantidades de pó de mucuna cinza sem granulometria específica (0,010 g, n=4; 0,050 g, n=3; e 0,100 g, n=3) foram misturadas com solução aquosa de HCl 1,14 M (1,500 mL) em vórtex (1 min); submetidas a ultrassom Unique mod. USC 700 em 45 W e 40 kHz (10 min) e centrifugadas (7200 g, 10 min). Uma alíquota do sobrenadante (0,100 mL) foi diluída em água ultrapura (0,900 mL), para injeção no cromatógrafo (adaptado de [77]). Após a escolha da melhor tomada de amostra, verificou-se o número de extrações para extração exaustiva. A tomada de amostra escolhida (n=5) foi extraída diversas vezes com o mesmo método até a levodopa não ser mais quantificada pelo cromatógrafo, definindo o número de extrações para a retirada total da levodopa.

Um planejamento fatorial completo 2^4 com ponto central foi executado para a definição do método de extração. O pó de mucuna preta foi peneirado em tamis 0,250 mm/60 mesh (ABNT 60 marca Granulotest). Amostras do pó de granulometria inferior a 0,250 mm (0,050 g) foram agitadas com solução de HCl (1,500 mL, pH 1 ou 4) em vórtex (1 min) e extraídas com ultrassom Unique mod.USC 700 em 45 W e 40 kHz (10 min ou 20 min, a 20 °C ou 40 °C). As amostras foram centrifugadas (10 min, 7200 g) e o sobrenadante foi transferido para um balão volumétrico de 5 mL. O número de extrações foi definido conforme o planejamento fatorial (uma ou três extrações), sendo que as extrações subseqüentes foram adicionadas ao balão volumétrico contendo a primeira extração. O volume do balão foi completado com HCl 1,14 M. Uma alíquota do sobrenadante (0,100 mL) foi diluída com água ultra-pura (0,900 mL) para injeção no cromatógrafo. O ponto central foi obtido com duas extrações em pH 2,5 por 15 min a 30 °C de ultrassom (n=3).

3.1.2 Curva analítica e linearidade

Usou-se padronização externa com levodopa (0,0100 g) em balão volumétrico (5 mL) dissolvida em solução aquosa de HCl 1,14 M. Essa solução foi diluída para cinco concentrações diferentes, com HCl 1,14 M, para a linearidade do método. Determinou-se o coeficiente de correlação (r), equação da reta, desvio padrão relativo (DPR%), eficiência em pratos teóricos (N), fator de capacidade (K') e caudamento a 5% ($T_{5\%}$).

3.1.3 Definição da exatidão do método

Para esse teste, definiu-se o teor de uma amostra de levodopa grau farmacêutico (“padrão”) com a finalidade de fortificar uma amostra de pó de mucuna preta para o teste de exatidão. Foram pesadas amostras de levodopa “padrão” (0,0150 mg, n=3) e diluídas com solução aquosa de HCl 1,14 M (10 mL) em balão volumétrico. Uma alíquota (0,050 mL) foi diluída com água ultra-pura (0,950 mL) para injeção no cromatógrafo. Foram pesadas 12 amostras de pó de mucuna preta de granulometria inferior a 0,250 mm (1,0000 g) e misturadas com quantidades de padrão de levodopa (0,0240 g; 0,0180 g; 0,0120 g, com n=3 para cada massa de

padrão, além de n=3 sem padrão). As amostras foram agitadas com HCl 1,14 M (30 mL) em vórtex (2 min), submetidas a ultrassom Unique mod.USC 700 em 45 W e 40 kHz (10 min a 20 °C), centrifugadas em centrífuga Labnet Force 7 (10 min a 7200 g) e o sobrenadante recolhido em balão volumétrico (100 mL). A extração foi repetida duas vezes e os sobrenadantes foram recolhidos no mesmo balão, que foi completado com HCl 1,14 M. Uma alíquota (2 mL) foi centrifugada (5 min, 7200 g); esse sobrenadante foi diluído (0,100 mL) com água ultra-pura (0,900 mL) para injeção no cromatógrafo. A exatidão dos valores foi mensurada nesse caso, por meio da recuperação, sendo:

$$\text{RECUPERAÇÃO\%} = \frac{\text{Me} \times 100}{\text{CT}} \quad (\text{EQUAÇÃO 1})$$

e pela determinação do erro relativo (ER%) [78], dado pela fórmula:

$$\text{ER\%} = \frac{(\text{CT} - \text{Me}) \times 100}{\text{CT}} \quad (\text{EQUAÇÃO 2})$$

onde Me é a média da concentração dos valores e CT é a concentração teórica adicionada [63].

3.1.4 Definição da precisão do método

Executou-se a precisão do método a 100% da concentração do teste com o pó de mucuna preta, de granulometria inferior a 0,250 mm (0,050 g, n=6) e em três concentrações diferentes (0,040 g, 0,050 g e 0,060 g, n=3). As amostras foram agitadas com HCl 1,14 M (1,500 mL) em vórtex (1 min), submetidas a ultrassom Unique mod.USC 700 em 45 W e 40 kHz (10 min, 20 °C) e centrifugadas em centrífuga Labnet Force 7 (10 min, 7200 g). Decantou-se o sobrenadante para um balão volumétrico (5 mL) e o precipitado foi extraído mais duas vezes (três extrações). Os sobrenadantes foram recolhidos no mesmo balão, que foi completado com HCl 1,14 M. Uma alíquota (0,100 mL) foi diluída com água ultra-pura (0,900 mL) para a injeção no cromatógrafo. A precisão foi expressa como desvio padrão relativo, DPR%, segundo a fórmula:

$$\text{DPR\%} = \frac{\text{DP} \times 100}{\text{Me}} \quad (\text{EQUAÇÃO 3})$$

onde DP é o desvio padrão das amostras e Me é a média das amostras [63].

3.1.5 Definição da robustez do método

Os dados para a preparação de amostra com planejamento fatorial também foram utilizados para avaliar a robustez da preparação da amostra (item 3.1.1.2). Além disso, o método cromatográfico foi avaliado para a determinação da robustez. Um planejamento fatorial completo 2^2 com ponto central foi executado com relação aos fatores fluxo (0,8 e 1,2 mL.min⁻¹) e composição da fase móvel (77% e 83% de água em metanol). O ponto central (n=3) foi obtido com 1 mL.min⁻¹ e 80% de água em metanol. Avaliaram-se, ao invés do teor de levodopa obtida, o fator capacidade (K'), o caudamento a 5% do pico (T_{5%}) e a resolução dos picos (R).

3.2 Determinação de levodopa em variedades de mucuna

3.2.1 Quantificação da levodopa em variedades de mucuna

Após a definição da tomada de amostra e do número de extrações, usou-se o método em 3.1.1.2 para o doseamento da levodopa em amostras das três variedades, sendo inclusive mensurado para diferentes granulometrias. Amostras de grãos de variedades de mucuna (6 g) foram moídas e peneiradas em tamis de 0,250 mm/60 mesh (ABNT 60 marca Granulotest). Alíquotas do pó (0,050 g, n=5) de granulometria inferior a 0,250 mm foram misturadas com HCl 1,14 M (1,5 mL) em vórtex (1 min), submetidas a ultrassom Unique mod.USC 700 em 45 W e 40 kHz (10 min) e centrifugadas em centrífuga Labnet Force 7 (7200 g por 10 min). Uma alíquota do sobrenadante (0,100 mL) foi diluída em água ultrapura (0,900 mL), para injeção no cromatógrafo. O resíduo foi extraído exaustivamente de acordo com o método de análise determinado.

3.2.2 Influência da granulometria no processo de extração para CLAE

As sementes de mucuna foram trituradas em micro moinho tipo Willye, modelo TE-648, marca Tecnal, no laboratório de pesquisa. Foram, em seguida, tamisadas e quantificadas conforme o método determinado. Após a definição da tomada de amostra e número de extrações necessárias, aplicou-se a metodologia escolhida para a determinação da influência da granulometria na extração, com as duas granulometrias menores do pó (entre 0,590-0,250 mm e menores que 0,250 mm) nas três variedades de mucuna. Usaram-se peneiras de 0,590 mm/28 mesh (ABNT 30, marca Granulotest) e 0,250 mm/60 mesh (ABNT 60 marca Granulotest), com uma amostragem de 10 g de cada variedade. Os pós foram classificados conforme a Farmacopéia Brasileira IV edição [79]. Alíquotas (0,050 g, n=5) de cada granulometria foram misturadas com HCl 1,14 M (1,5 mL) em vórtex (1 min), submetidas a ultrassom Unique mod.USC 700 em 45 W e 40 kHz (10 min) e centrifugadas em centrífuga Labnet Force 7 (7200 g, 10 min). O sobrenadante foi recolhido em balão volumétrico (5 mL) e o resíduo sofreu novas extrações de acordo com o definido para a extração. O volume do balão foi completado com HCl 1,14 M e uma alíquota (0,100 mL) foi diluída em água ultrapura (0,900 mL) para injeção no cromatógrafo.

3.3 Obtenção do extrato seco por Spray Drying

3.3.1 Obtenção dos extratos atomizados

Para a obtenção do extrato seco, usou-se um planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} com ponto central foi executado para a obtenção de extratos líquidos com diferentes métodos de extração, para posterior secagem por *spray dryer*. O pó da variedade preta (10,00 g) de granulometria inferior a 0,250 mm, extraído com de água destilada (270 mL) na ausência de luz, sob agitação com auxílio de agitador mecânico marca IKA, com velocidade de 60 a 2000 rpm. Após, o líquido foi centrifugado em centrífuga Jouan Br4i e o sobrenadante decantado. Foi retirada uma alíquota (12 mL) do sobrenadante (extrato centrifugado) para doseamento do extrato líquido por CLAE (antes do processo de secagem do extrato) e determinação do rendimento por peso seco em estufa, sendo atomizado o volume restante da 1ª extração. O resíduo da centrifugação foi extraído novamente sob as mesmas

condições, originando a 2^a extração, para mensuração do peso seco e doseamento do extrato líquido. As variáveis e níveis foram: velocidade da hélice de agitação mecânica (288 e 1200 rpm); tempo de agitação (10 e 30 min); força de centrifugação (1800 e 3600 g); e tempo de centrifugação (5 e 10 min). O ponto central (n=3) foi obtido as seguintes condições: velocidade da hélice a 744 rpm por 20 min, centrifugação por 7,5 min a 2700 g. A atomização das primeiras extrações foram feitas em atomizador do tipo mini *spray dryer*, marca Büchi, modelo B-290, com atomizador de 0,7 mm de diâmetro, tampa de rosca de 1,5 mm de diâmetro, com fluxo da mistura em 15 mL.min⁻¹, fluxo de ar a 38 m³.h⁻¹, volume de gás de arraste do *spray* (real) de 667 L.h⁻¹ e temperatura de atomização a 150 °C.

3.3.2 Determinação do peso seco

Os rendimentos de peso seco foram definidos por meio da obtenção do peso seco dos extratos centrifugados. Alíquotas (3 mL) desses extratos foram colocadas em placas de Petri devidamente pesadas e submetidas a 105 °C em estufa de secagem por 4 h. As placas foram retiradas da estufa, resfriadas em dessecador e pesadas. As placas foram novamente colocadas em estufa por mais uma hora e o processo foi repetido até peso constante, sendo o peso seco determinado. Os resultados foram avaliados com planejamento fatorial fracionado 2⁴⁻¹ com ponto central, tendo as mesmas variáveis e níveis do item 3.3.1.

3.3.3 Quantificação dos extratos antes e depois da atomização

Alíquotas (2 mL) dos extratos centrifugados (1^a e 2^a extrações) foram centrifugadas novamente em centrífuga Labnet Force 7 (7200 g, 10 min). O sobrenadante (0,050 mL) foi diluído em água ultrapura (0,950 mL), para a quantificação de levodopa em CLAE.

Uma porção (0,0150 g) dos extratos obtidos por *spray dryer* (1^a extração) foi diluída com solução aquosa de HCl 1,14 M (1,500 mL) em vórtex (1 min), submetida a ultrassom (10 min) e centrifugada (7200 g, 10 min). O sobrenadante (0,100 mL) foi diluído em água ultrapura (0,900 mL) para a quantificação de levodopa em CLAE.

3.4 Isolamento de levodopa

Uma amostra do pó de mucuna cinza (200 g) foi deslipidificada com acetona [8](330 mL) em ultrassom por 10 min. A mistura foi filtrada e o resíduo foi novamente extraído com acetona (330 mL) com o mesmo procedimento mais três vezes. O resíduo da filtração foi submetido ao ultrassom Unique mod.USC 700 em 45 W e 40 kHz (20 min) com água:etanol 50:50 (800 mL) contendo 0,5% de ácido ascórbico. Após a extração, o líquido foi filtrado e o resíduo foi novamente extraído com água:etanol 50:50 (800 mL) com 0,5% de ácido ascórbico mais quatro vezes. Os filtrados etanólicos foram reunidos e concentrados em evaporador rotatório sob pressão reduzida (cerca de 300 mL), sendo esse congelado por uma semana. Após o descongelamento, o líquido (EP20) apresentou um precipitado amorfo, que foi separado por filtração em funil de Büchner com pressão reduzida. Esse precipitado (EP201), foi disperso em mistura de água:etanol 50:50 (v/v), aquecida em torno de 60 °C (40 mL). Após o resfriamento da mistura, essa foi centrifugada (10 min a 1800 g) e a purificação com água:etanol 50:50 (v/v) foi repetida mais cinco vezes. O EP201 foi seco em estufa a 105 °C por 4 horas e seu peso determinado.

3.4.1 Análises para identificação de EP201

Uma parte de EP201 (0,0150 g) foi ressuspensa em água ultra-pura (25 mL) e esse líquido foi cromatografado em camada delgada (CCD) de sílica gel G, como o padrão de levodopa. A fase móvel foi diclorometano: metanol: ácido acético (72,7:18,2:9,1) (v/v), sendo a placa revelada com ninhidrina (0,5% em *n*-butanol: acetona 50:50) ou com NP/PEG (NP: difenilboriloxietilamina 1% em metanol p/v; PEG: polietilenoglicol-4000 5% em etanol p/v), ambas reveladas com aquecimento a 105 °C/10 min. Além disso, uma alíquota da solução aquosa de EP201 foi injetada no CLAE para verificação de pureza e determinação do espectro no UV, bem como obtenção do tempo de retenção. Alguns cristais de EP201 foram submetidos à espectroscopia no infravermelho no equipamento Biorad Excalibur FTS3500GX com software Biorad Merlin 3.0 - com KBr, para a definição de grupos funcionais.

Para a obtenção da massa molar, um espectro de massas foi obtido, por espectrometria em *turbo spray*, com voltagem do spray de íons de -2500,0 V,

potencial de desaglomeração (*declustering potential*) de -50,0 V (modo negativo) [M-H]⁺ por infusão, em água:metanol 50:50 (v/v). Utilizou-se cromatógrafo em fase líquida contendo módulo desgaseificador, bomba quaternária, forno de coluna e amostrador automático modelo 1100, marca Agilent Technologies, acoplado a espectrômetro de massas triplo quadrupolo modelo API 3000, com interfaces *electrospray* e de ionização química, marca Applied Biosystems/MSD/ Sciex e gerador de ar e nitrogênio de alta pureza 99,999%, marca Peak Scientific. O gás nebulizador foi ar, a 8 psi, com cortina de N₂, com 9 psi e gás secante como o ar sintético a 8 L.min⁻¹.

Além disso, também foram realizadas análises de ressonância magnética nuclear (RMN) de ¹H e de ¹³C, além da análise por DEPT 135 (intensificação sem distorção por transferência de polarização – *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*). A substância EP201 foi dissolvida em água deuterada grau analítico para análise de RMN de ¹H em 400 MHz e, para RMN de ¹³C em 100 MHz foi utilizado DMSO-*d*₆ (dimetilsulfóxido deuterado grau analítico) para solubilizar a amostra. Utilizou-se equipamento de RMN marca Bruker Analytik GmbH.

3.5 Separação enantiomérica de EP201

3.5.1 Otimização da separação dos enantiômeros da dopa e separação de EP201

Para se averiguar se a substância isolada EP201 é um enantiômero da dopa ou uma mistura racêmica da mesma, um método de separação quiral por CLAE foi desenvolvido. Utilizou-se, na otimização do método de separação, um planejamento fatorial 2³ em duplicata de todos os pontos, com as seguintes variáveis: fluxo (0,8 e 1 mL.min⁻¹), composição da fase móvel (acetonitrila ou metanol) e concentração do solvente orgânico na fase móvel (60 e 70%).

Para a separação cromatográfica, o metanol e a acetonitrila utilizados foram grau CLAE (Merck). A água ultrapura foi obtida por meio de água bidestilada, purificada por sistema MiliQ (Millipore®), tendo o acréscimo de H₃PO₄ grau analítico (marca Synth) até pH 3,03, sendo a solução posteriormente filtrada sob pressão reduzida através de membrana HV (Durapore) em PVDF (fluoreto de polivinilideno), marca Milipore® com 0,45 µm de tamanho de poro.

Usou-se cromatógrafo líquido de alta eficiência, marca Varian[®], com bomba quaternária modelo 9012, injetor automático modelo AI200, alça de 20 µL e detector eletroquímico modelo 9080 Varian[®], com eletrodo de carbono vítreo e solução de prata. Para a separação dos isômeros da dopa utilizou-se coluna Chirosil RCA(+)-51001546, 150 mm x 4,6 mm de diâmetro interno, marca RStech. A aquisição dos dados foi obtida por software Star LC Workstation[®] versão 6.0.

Para a separação aplicou-se uma mistura de L-dopa e D-dopa (padrões analíticos marca Sigma Aldrich), na concentração de 2,73 µg.mL⁻¹ cada. A resposta foi avaliada pela resolução obtida - R - e a ordem de eluição foi determinada pela injeção do enantiômero puro com configuração conhecida. Após a escolha do melhor método de separação, aplicou-se uma solução de 3 µg.mL⁻¹ de EP201 para a verificação da presença dos enantiômeros. As soluções foram feitas nas fases móveis, para minimizar o ruído no cromatograma.

3.6 Doseamento de fenólicos totais em mucuna por meio do reativo de Folin-Denis

3.6.1 Preparo do reativo de Folin-Denis

O reativo de Folin-Denis foi obtido misturando-se tungstato de sódio diidratado grau analítico marca Sigma Aldrich (Na₂WO₄.2H₂O, 20 g), ácido fosfomolibdico grau analítico marca Merck (fórmula aproximada 20 MoO₃P₂O₅.51H₂O, 4 g) e ácido fosfórico grau analítico marca Synth (solução a 85% em água, p/v, 10 mL) em água destilada (150 mL). A mistura foi levada à ebulição sob refluxo por duas horas e, depois de resfriada, seu volume foi completado em balão volumétrico (200 mL) com água destilada [80].

3.6.2 Curva analítica com ácido 3-hidroxicinâmico (3HC) e linearidade

Dissolveu-se uma porção de 3HC padrão analítico marca Sigma (0,0107 g) com água destilada em balão volumétrico (25 mL), originando uma solução estoque na concentração de 0,428 mg.mL⁻¹. A diferentes volumes da solução-estoque foram

adicionados o reativo de Folin-Denis (1,25 mL) e solução saturada de Na_2CO_3 (sal de grau analítico marca Biotec, 2,5 mL) [80]. O volume foi completado com água em balão volumétrico (25 mL); após 30 min, a absorvância foi medida em 720 nm, em espectrofotômetro Shimadzu, mod. UV-2401PC, UV-vis com software UVPC 3.91, com auxílio de cubeta de vidro, sendo o branco todos os componentes da mistura menos a solução de padrão. A curva analítica foi traçada, calculando-se o coeficiente de correlação linear (r) e a equação linear da reta.

3.6.3 Obtenção do método de extração para o doseamento de fenólicos totais em mucuna

Foi executado um planejamento fatorial completo 2^4 , com ponto central ($n=3$), para a definição do método de extração visando a extração máxima de substâncias fenólicas. Amostras de pó de mucuna preta de granulometria inferior a 0,250 mm foram extraídas com as seguintes variações: tempo de extração (5 ou 10 min), líquido extrator (água deionizada ou etanol), presença (ou ausência) de HCl 1,14 M no líquido extrator, tipo de extração (agitação por ultrassom marca Unique mod.USC 700 em 45 W e 40 kHz ou agitação por vórtex marca Genie®). O ponto central ($n=3$) consistiu de extração em mistura água:etanol 50:50 (v/v) com HCl 0,57 M por 3,75 min no vórtex e 3,75 min no ultrassom. O pó de semente (0,050 g) foi misturado ao líquido extrator (1,5 mL) e extraído pelo tempo e método de extração estabelecido. A mistura foi centrifugada em centrífuga Labnet Force 7 (10 min, 7200 g) e o sobrenadante coletado em um balão volumétrico (10 mL). O processo foi repetido uma vez, sendo esse sobrenadante recolhido com o sobrenadante da 1ª extração, no mesmo balão volumétrico, e o volume final foi completado com água destilada. A uma alíquota desse extrato (0,4 mL) adicionou-se o reativo de Folin-Denis (1,25 mL) e uma solução saturada de Na_2CO_3 (2,5 mL) [80]; o volume final foi completado com água em balão volumétrico de 25 mL; após 30 min, a absorvância foi medida em 720 nm com auxílio de cubeta de vidro, sendo o branco todos os componentes da mistura menos o extrato e comparada com a curva analítica.

3.6.4 Doseamento de fenólicos totais por reativo de Folin-Denis

Após a determinação do melhor método de extração, esse foi aplicado para se determinar o teor de fenólicos totais nos pós das variedades de *M. pruriens* (cada n=6). Foram pesadas amostras de pó, com granulometria inferior a 0,250 mm (0,050 g) e extraídas conforme o método. A uma alíquota dessa mistura (0,4 mL) foi adicionado o reativo de Folin-Denis (1,25 mL), seguido da adição de solução saturada de Na_2CO_3 (2,5 mL) [80] e volume final completado com água em balão volumétrico (25 mL); após 30 min, a absorvância foi medida em 720 nm e comparada com a curva analítica para a determinação da concentração. Os resultados foram transcritos como concentração de fenólicos em relação à massa pesada de pó da semente.

3.7 Validação da metodologia de quantificação da levodopa em plasma

Para a validação de um fitoterápico há a necessidade de um método para análise de um marcador em amostra biológica para testes pré-clínicos (em animais). Para tal, desenvolveu-se uma metodologia de separação da levodopa em plasma de ratos, por meio de CLAE e detector eletroquímico, com auxílio de cromatografia de par iônico. Usou-se cromatógrafo líquido de alta eficiência, marca Varian®, com bomba quaternária modelo 9012, injetor automático modelo AI200 e alça de 20 μL , detector eletroquímico modelo 9080 Varian®, com detector de carbono vítreo e solução de prata. Os dados foram adquiridos com o software Star LC Workstation® versão 6.0. A fase estacionária foi uma coluna Varian Res Elut C_{18} , 5 μm , tamanho de poro de 90 Å, 150 mm x 4,6 mm de diâmetro interno (i.d.), de aço inoxidável e coluna guarda de mesmas características, porém com o comprimento de 10 mm.

3.7.1 Definição da fase móvel e adequação do sistema

A fase móvel consistiu em 12,715 mM de octanossulfonato de sódio marca Aldrich, 0,054 mM de etilenodiaminotetracetato dissódico (EDTA dissódico) marca Biolab, 10,9 mM de ácido cítrico marca Biolab, 25 mM de fosfato diácido de sódio marca Biotec em água ultrapura (água bidestilada, purificada por sistema MiliQ - Millipore®), com pH ajustado para 3,00 em pHmetro com H_3PO_4 grau analítico marca

Synth. Depois disso, a solução foi filtrada através de membrana HV (Durapore) em PVDF (fluoreto de polivinilideno), marca Milipore® com 0,45 µm de tamanho de poro. Em seguida, foram adicionados 10% de metanol grau CLAE, sendo essa fase móvel submetida a ultrassom marca Unique por 10 min. A coluna cromatográfica foi ambientada com fluxo de 1 mL.min⁻¹ durante 4 h, no início de cada dia de análise, para que o sistema de IPC se estabilizasse.

Na adequação do sistema, verificou-se o fator capacidade (K'), resolução (R), número de pratos teóricos (N) e caudamento do pico a 5% ($T_{5\%}$). Para garantir a pureza do pico da levodopa, um cromatograma foi obtido com a levodopa (marca Sigma Aldrich) e os metabólitos comuns da mesma: ácido homovanílico (HVA), ácido 3,4-diidroxifenilacético (DOPAC), 3-O-metil-dopa (3OMD) (marca Sigma Aldrich), dopamina hidrocloreídrica e o padrão interno hidrobrometo de diidroxibenzilamina (DHBA) (marca Merck).

3.7.2 Definição do método de extração para separação em sangue

Utilizaram-se ratos Wistar para os ensaios (aprovado pelo protocolo n° 145 do CEEA-UFPR), com cerca de 250 g de peso ($n=4$). Os animais foram previamente anestesiados com cetamina a 80 mg.kg⁻¹ e xilazina a 15 mg.kg⁻¹, por via intraperitoneal. O sangue foi colhido com heparina, na concentração de 30 UI.mL⁻¹ de sangue, por via intracardíaca. Os animais, após a coleta, foram sacrificados com auxílio de injeção intracardíaca de cetamina a 240 mg.kg⁻¹ e xilazina a 45 mg.kg⁻¹. O sangue coletado foi imediatamente centrifugado em centrífuga Labnet Force 7 (7200 g, 15 min). Separou-se o plasma e, em seguida, esse foi imediatamente congelado a -18 °C. O plasma foi descongelado no momento do uso para todas as análises, sendo o(s) analito(s) somente acrescentado(s) momentos antes dos experimentos.

O plasma (200 µL), após contaminação com o(s) padrão(ões), teve a adição de ácido perclórico a 60% (30 µL), e o volume foi completado (qsp. 1 mL) com a fase móvel descrita em 3.7.1.1. A mistura foi agitada em vórtex Genie® por 1 min e congelada por 15 min a -18 °C. Após isso, centrifugou-se a amostra em centrífuga Labnet Force 7 (7200 g, 10 min). Separou-se o sobrenadante, sendo que esse foi novamente congelado (15 min) e centrifugado (7200 g, 10 min). O sobrenadante foi recolhido e injetado no cromatógrafo.

3.7.3 Curva analítica da levodopa em plasma e linearidade

Usou-se padronização externa com levodopa (marca Merck, padrão analítico) em plasma. Preparou-se uma solução de levodopa a $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para a elaboração da curva analítica. A curva foi planejada com o acréscimo de diferentes volumes da solução de levodopa a $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (de 100 a 600 μL) em plasma (200 μL). Após isso, a mistura teve a adição de ácido perclórico a 60% (30 μL) e o volume foi completado (qsp. 1 mL) com a fase móvel descrita em 3.7.1.1. A mistura foi agitada em vórtex Genie[®] por 1 min e congelada por 15 min a -18°C . Após isso, centrifugou-se a amostra (centrífuga Labnet Force 7, 7200 g, 10 min). Separou-se o sobrenadante, sendo que esse foi novamente congelado (15 min) e centrifugado (7200 g por 10 min). O sobrenadante foi recolhido e injetado no cromatógrafo. Visando a linearidade do método, determinou-se o coeficiente de correlação (r), equação da reta, desvio padrão relativo (DPR%), eficiência em pratos teóricos (N), fator de capacidade (K') e caudamento a 5% ($T_{5\%}$).

3.7.4 Definição da exatidão do método

Para a verificação da exatidão, seguiu-se o exigido pela legislação brasileira [63], por meio do cálculo da recuperação% (EQUAÇÃO 1) e do ER% (EQUAÇÃO 2) [78]. Prepararam-se três níveis de concentração (0,10; 0,30 e 0,50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, $n=5$) em plasma (200 μL), com o mesmo preparo de amostra definido em 3.7.2.

3.7.5 Definição da precisão do método

Para a verificação da precisão, seguiu-se o exigido pela legislação brasileira [63], por meio do cálculo de DPR% (EQUAÇÃO 3). Prepararam-se três níveis de concentração (0,10; 0,30 e 0,50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, $n=5$) em plasma (200 μL), com o mesmo preparo de amostra definido em 3.7.2.

3.7.6 Efeito matriz

Para a verificação do efeito matriz, duas curvas analíticas, com mesmas concentrações foram preparadas: uma na matriz biológica (plasma) e outra no solvente da fase móvel. Para a curva confeccionada na matriz biológica, o plasma (200 μL) teve a adição de ácido perclórico a 60% (30 μL) e, posteriormente, o volume foi completado (qsp. 1 mL) com a fase móvel descrita em 3.7.1. A mistura foi agitada em vórtex Genie[®] por 1 min e congelada por 15 min a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após isso, centrifugou-se a amostra em centrífuga Labnet Force 7 (7200 g , 10 min). Separou-se o sobrenadante, sendo esse novamente congelado (15 min) e centrifugado (7200 g , 10 min). O sobrenadante foi recolhido e só então misturado com a solução do padrão, para a elaboração da curva analítica. A mistura foi injetada no cromatógrafo. Para a análise do efeito matriz, foram analisados os coeficientes angulares das duas curvas por meio do teste F , para a verificação de diferenças significativas [81].

3.7.7 Definição da robustez do método

Para a mensuração de pequenas variações com relação ao método cromatográfico, um planejamento fatorial foi realizado com 2^2 amostras, cada uma com $n=3$, alterando-se a concentração de metanol na fase móvel (8% e 12%) e fluxo (0,8 e 1,2 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$). Analisou-se o fator capacidade (K'), o caudamento a 5% do pico ($T_{5\%}$) e a resolução dos picos (R), ao invés da quantidade de levodopa obtida.

3.7.8 Doseamento de levodopa em plasma de animais tratados

Com a finalidade de verificar se o método validado se aplica, animais foram tratados com o padrão de levodopa mais benzerazida por via intraperitoneal (protocolo aprovado pelo certificado n° 145 do CEEA - UFPR). Ratos Wistar machos ($n=2$), com peso cerca de 250 g, foram tratados com uma mistura de levodopa grau farmacêutico marca DEG (100 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de peso de animal) e benzerazida marca Merck (25 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de peso de animal) diluída em água destilada, por via intraperitoneal. Após 30 min da aplicação, os animais foram anestesiados com auxílio

de cetamina a 80 mg.kg^{-1} e xilazina a 15 mg.kg^{-1} , por via intraperitoneal. O sangue foi colhido com heparina, na concentração de 30 UI.mL^{-1} de sangue, por via intracardíaca. Os animais, após a coleta, foram sacrificados com auxílio de injeção intracardíaca de cetamina a 240 mg.kg^{-1} e xilazina a 45 mg.kg^{-1} . O sangue coletado foi imediatamente centrifugado a 7200 g por 15 min. Separou-se o sobrenadante (plasma) com auxílio de uma pipeta e, em seguida, esse foi imediatamente congelado a $-18 \text{ }^{\circ}\text{C}$. O plasma foi descongelado somente no momento da análise.

O plasma ($200 \text{ }\mu\text{L}$), após contaminação com uma solução a $10 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ de padrão interno hidrobrometo de diidroxibenzilamina (DHBA, marca Merck) ($60 \text{ }\mu\text{L}$), teve a adição de ácido perclórico a 60% ($30 \text{ }\mu\text{L}$), e posteriormente o volume foi completado (qsp. 1 mL) com a fase móvel descrita em 3.7.1. A mistura foi agitada em vórtex Genie[®] por 1 min e congelada por 15 min a $-18 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Após isso, centrifugou-se a amostra em centrífuga Labnet Force 7 (7200 g , 10 min). Separou-se o sobrenadante, sendo que esse foi novamente congelado (15 min) e centrifugado (7200 g por 10 min). O sobrenadante foi recolhido ($200 \text{ }\mu\text{L}$), diluído com fase móvel descrita em 3.7.1 (qsp. $800 \text{ }\mu\text{L}$) e essa mistura foi injetada no cromatógrafo. Para a confirmação da separação, verificaram-se os parâmetros de adequação do sistema: fator capacidade (K'), resolução (R), número de pratos teóricos (N) e caudamento do pico a 5% ($T_{5\%}$).

4 Resultados e Discussão

4.1 Validação da metodologia de quantificação de levodopa em mucuna

4.1.1 Definição do método analítico por CLAE

4.1.1.1 Definição do método de separação e adequação do sistema

Em CLAE, após o preparo de amostra, o pico referente à levodopa foi verificado em 3,5 min, totalmente separado dos outros componentes da matriz das sementes (em todas as variedades). O perfil no UV desse pico foi idêntico ao do padrão, como exemplificado na fig. 7 para a variedade cinza, sendo confirmado pela co-eluição. A adequação do sistema forneceu $R > 2$, $K' = 2,4$; $N = 2800$ e $T_{5\%} = 1,87$, estando de acordo com o recomendado, que apresenta resolução acima de 2, fator capacidade entre 2 e 10, número de pratos maior que 2000 e caudamento a 5% menor que 2 [72]-[76].

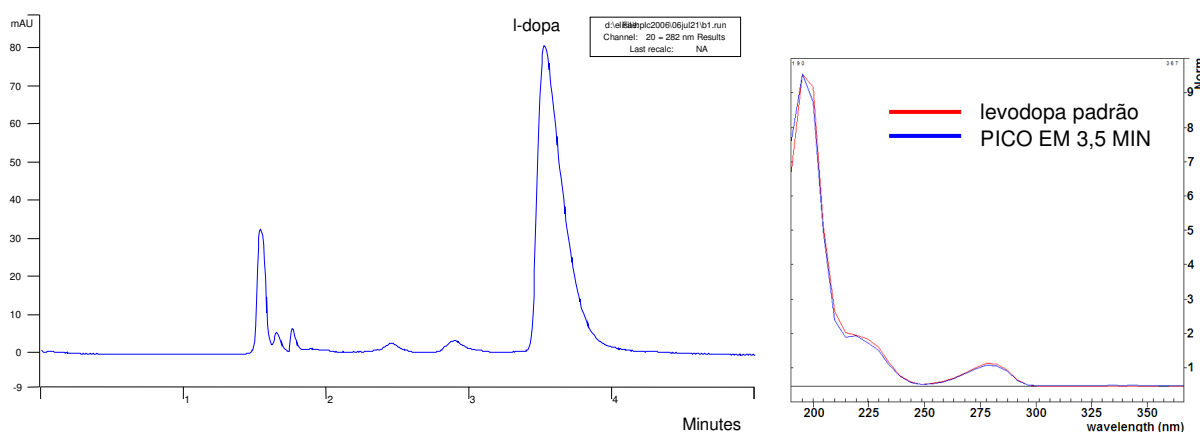


FIGURA 7 - CROMATOGRAMA DE AMOSTRA DE PÓ DE MUCUNA CINZA E ESPECTRO NO UV DO PADRÃO DE LEVODOPA E DO PICO EM 3,5 MIN *

* cromatograma em $\lambda = 282$ nm, fase móvel 20% metanol:água, modo isocrático, 1 mL.min⁻¹, 25 °C, coluna Res Elut C₁₈

4.1.1.2 Definição do método de extração para CLAE

Para definir qual seria a melhor quantidade de massa para extração, variou-se a tomada de amostra de pó de semente da var. cinza. O extrato obtido com 0,010 g não foi diluído para a análise. O valor da 1^a extração foi $3,84 \pm 0,654\%$ de

levodopa no pó (DPR%=13,2). O alto DPR% é explicado pela quantidade amostrada: a tomada de amostra não é representativa, e é somada ao fato de que o pó tem variação granulométrica. Já o extrato obtido com 0,100 g de pó necessitou de duas centrifugações (7200 g, 10 min) e foi diluído (0,050 mL com 0,950 mL de água). A 1^a extração apresentou $4,153 \pm 0,1581\%$ de levodopa no pó (DPR%=2,56). Nesse caso, a solubilidade da levodopa foi de $2,77 \text{ mg.mL}^{-1}$ (em HCl 1,14 M), acima do limite de solubilidade em água ($1,65 \text{ mg.mL}^{-1}$) [84]. Como isso é uma fonte de erro, essa tomada de amostra foi descartada.

O extrato obtido com 0,050 g de pó e 1,500 mL de HCl 1,14 M foi diluído (0,100 mL de extrato com 0,900 mL de água). A primeira extração forneceu $4,28 \pm 0,116\%$ de levodopa no pó (DPR%=1,82). A concentração de levodopa foi de $1,43 \text{ mg.mL}^{-1}$ e não ultrapassou o limite de solubilidade, sendo a amostragem escolhida.

A tomada de amostra de 0,0500 g, extraída com 1,500 mL de HCl 1,14 M foi submetida à extração exaustiva. Após a primeira extração e centrifugação, o sobrenadante foi totalmente retirado para a diluição (0,100 mL com 0,900 mL, para injeção no cromatógrafo), e o resíduo novamente extraído com 1,5 mL de HCl 1,14 M, com a mesma metodologia. Isso foi repetido até a obtenção de cinco extrações. Percebeu-se que, após a terceira extração, a levodopa foi totalmente extraída (fig. 8); essa extraiu somente $0,153 \pm 0,229\%$ do total. O valor médio total de levodopa em pó de mucuna cinza foi $4,20 \pm 0,173\%$ (DPR%=3,58). Quando se compara o teor de levodopa de três extrações ($4,20 \pm 0,173\%$) com o relativo a uma extração somente ($4,28 \pm 0,116\%$), percebeu-se que há perdas no teor em função do processo, provavelmente oxidação da levodopa em função do maior tempo de espera para a conclusão das três extrações.

Provavelmente, a otimização de parâmetros experimentais seja uma das etapas mais críticas do trabalho científico [85]. Na maioria dos casos, essa abordagem é realizada de forma univariada, ou seja, avalia-se somente uma variável por vez (OVAT – *one variable at a time*). Embora seja um procedimento eficaz, OVAT não se mostra o mais eficiente dos métodos, no que diz respeito à exploração do espaço experimental, por negligenciar a interação entre as variáveis, resultando em condições que nem sempre levam ao ótimo verdadeiro [85][86].

Nos sistemas químicos, as variáveis costumam interagir fortemente, por mecanismos resultando em efeitos sinérgicos e antagônicos. Se este fato é

ignorado, o processo de otimização detém pouco valor [85][87]. A utilização do planejamento fatorial de experimentos gera combinações de diversas variáveis simultaneamente. Na abordagem do planejamento fatorial, as variáveis são primeiramente avaliadas para determinar quais são importantes para o resultado [86]. As variáveis de interesse que realmente apresentem influências significativas na resposta são avaliadas ao mesmo tempo [87] por meio de uma matriz matemática.

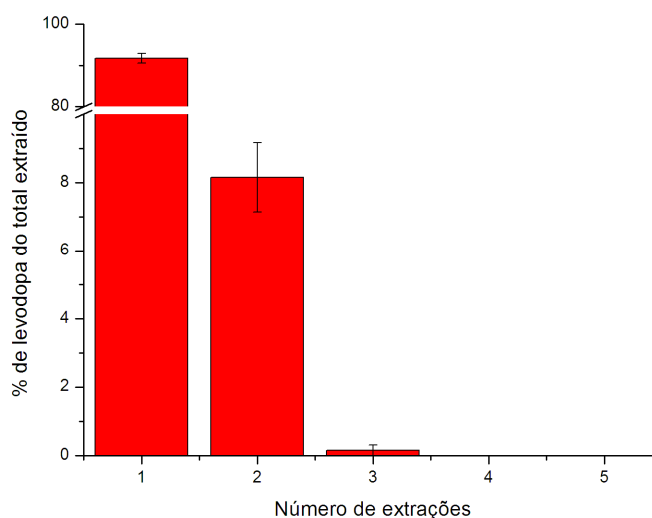


FIGURA 8 - TEOR DE LEVODOPA NA EXTRAÇÃO EXAUSTIVA DE 0,0500 g DE MUCUNA CINZA

Em um planejamento fatorial são investigadas as influências de todas as variáveis experimentais de interesse e os efeitos de interação nas respostas. Se a combinação de k fatores é investigada em dois níveis, um planejamento fatorial consistirá de 2^k experimentos [88]. Em geral, os planejamentos fatoriais do tipo 2^k são os mais comuns. Um dos aspectos favoráveis deste tipo de planejamento é a realização de poucos experimentos, quando comparado ao método OVAT. Torna-se óbvio que com um número reduzido de níveis não é possível explorar completamente uma grande região no espaço das variáveis. Entretanto, são observadas tendências importantes para investigações posteriores [89].

No planejamento fatorial relativo a otimização do preparo de amostra na extração de levodopa, construiu-se uma matriz de contrastes totalizando 16 amostras, com mais três amostras relativas às condições intermediárias, que compõem o ponto central (tab. 1).

TABELA 1 – MATRIZ DE CONTRASTES PARA A OTIMIZAÇÃO DO PREPARO DE AMOSTRA PARA A DETERMINAÇÃO DO TEOR DE LEVODOPA

Amostras	pH 1 (-) ou 4 (+)	tempo 10 min (-) ou 20 min (+)	n° extrações 1 (-) ou 3 (+)	temperatura 20 °C (-) ou 40 °C (+)
1	-1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1	-1
3	-1	1	-1	-1
4	1	1	-1	-1
5	-1	-1	1	-1
6	1	-1	1	-1
7	-1	1	1	-1
8	1	1	1	-1
9	-1	-1	-1	1
10	1	-1	-1	1
11	-1	1	-1	1
12	1	1	-1	1
13	-1	-1	1	1
14	1	-1	1	1
15	-1	1	1	1
16	1	1	1	1
pc1	0	0	0	0
pc2	0	0	0	0
pc3	0	0	0	0

Legenda: pc1, pc2 e pc3 são as replicatas do ponto central, nas condições: pH 2,5, tempo de 15 min, duas extrações e temperatura de 30 °C.

O gráfico normal dos efeitos (fig. 9) é uma representação gráfica que auxilia na definição de quais efeitos foram significativos para a otimização estudada. Os valores são dispostos num gráfico de acordo com o efeito padronizado que cada variável apresentou no eixo das abcissas (em relação ao desvio padrão obtido no ponto central) *versus* a probabilidade acumulada do efeito ocorrer (eixo das ordenadas). Para facilitar a visualização, o programa Minitab® apresenta, no gráfico, uma linha que divide o gráfico ao meio – à direita da linha estão as amostras que tiveram seus valores aumentados quando os níveis atribuídos passaram de (-) para (+). Efeitos não significativos são aqueles que, quando comparados ao desvio padrão do ponto central, não são estatisticamente diferentes; já os significativos apresentam efeito estatisticamente diferente ao desvio padrão do ponto central.

Observou-se, no gráfico normal dos efeitos em relação à extração de levodopa (fig. 9), que há um efeito de 1ª ordem com relação ao número de extrações, que quando passa de uma para três extrações, aumentou o teor de levodopa. Obteve-se um efeito de 2ª ordem com relação ao tempo de extração mais o número de extrações (fig. 10): quanto maior o tempo de extração com maior número de extrações, ocorreu uma diminuição no teor de levodopa. Isso pode ser explicado pela provável oxidação da levodopa com o decorrer do tempo para a conclusão das três extrações.

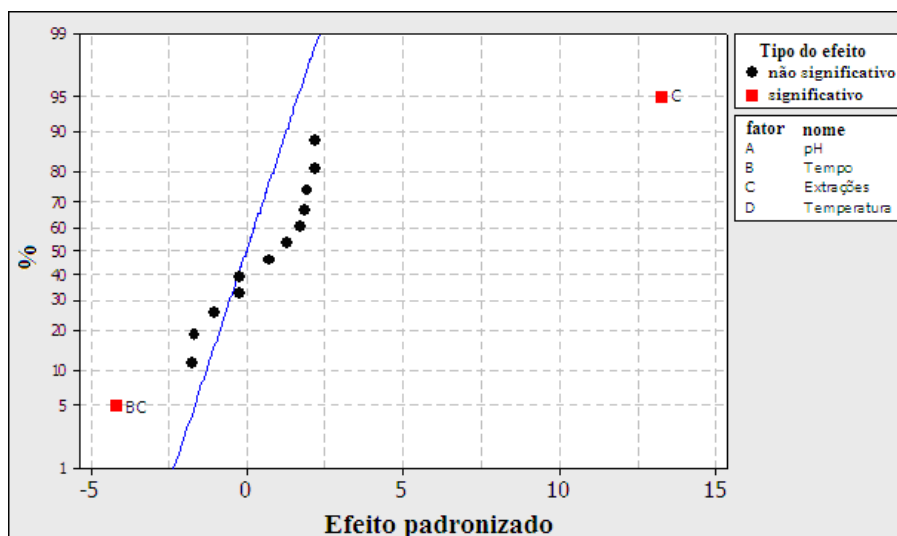


FIGURA 9 - GRÁFICO NORMAL DOS EFEITOS EM RELAÇÃO À EXTRAÇÃO DE LEVODOPA ($\alpha = 0,05$)

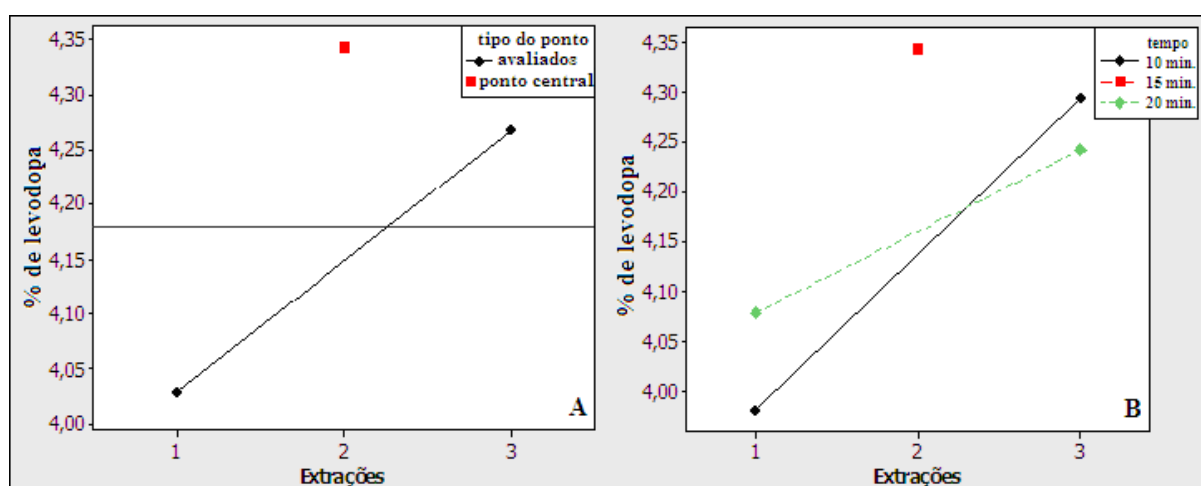
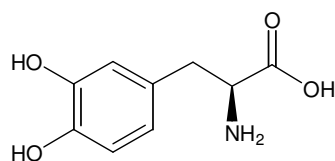


FIGURA 10 - GRÁFICOS DO EFEITO PRINCIPAL “NÚMERO DE EXTRAÇÕES” (A) E DE INTERAÇÃO ENTRE “TEMPO E NÚMERO DE EXTRAÇÕES” (B) EM LEVODOPA (%)

A levodopa detém quatro posições de ionização (fig. 11) [29]. A molécula estará ionizada em uma grande faixa de pH, o que tem grande influência na sua solubilidade.



pK_a da levodopa*	grupamento
2,3	carboxila
8,7	amina protonada
9,7	fenol
13,4	fenol

FIGURA 11 - ESTRUTURA DA LEVODOPA E pK_a S CORRESPONDENTES

Fonte: adaptado de DELGADO, PRABHU (1998) [29]

Como não se percebeu alteração do teor com o pH, escolheu-se o pH=1, pois pHs mais básicos dispersam proteínas, diminuindo a vida útil das colunas de CLAE; inclusive, os extratos em pH 4 eram mais turvos. O tempo de extração no sonificador não foi significativo; devido à interação de 2ª ordem com o número de extrações, escolheu-se o tempo de 10 min. A temperatura não apresentou influência, sendo escolhida a de manutenção mais fácil: 20 °C. As condições ideais encontradas foram pH 1, tempo de extração de 10 min, com três extrações a 20 °C. Com isso, o melhor método de extração consiste em agitar amostras de pó (granulometria inferior a 0,250 mm, 0,050 g) com solução de HCl 1,14 M (1,500 mL, pH 1) em vórtex (1 min) e extrair com ultrassom (10 min, 20 °C). As amostras devem ser centrifugadas (10 min, 7200 g) e o sobrenadante decantado para balão volumétrico (5 mL), sendo o processo repetido duas vezes (três extrações). O volume do balão deve ser completado com solução de HCl 1,14 M. Uma alíquota do sobrenadante (0,100 mL) deve ser diluída com água ultra-pura (0,900 mL) para injeção no cromatógrafo.

As extrações de levodopa da mucuna, citadas em literatura, envolvem água ou etanol, geralmente acidificados. Há métodos que usam extração em etanol com HCl ou não, duas ou três vezes (BRAIN, 1976¹, SZABO, 2001², apud [77]), extração aquosa com banho de água fervente por 6 min (MYHRMAN, 2000³ apud [77]), com ultrassom (St-LAURENT *et al.*, 2000⁴ apud [77]) ou com HCl em banho de gelo e agitação [11]. As vantagens do método definido no presente trabalho referem-se a definição das variáveis que influenciam o processo, bem como a exploração do espaço experimental no que diz respeito a efeitos sinérgicos ou antagônicos, que não são abordados nos processos citados na literatura.

4.1.2 Curva analítica e linearidade

As concentrações de levodopa englobaram o intervalo entre 10 a 200 µg.mL⁻¹. O r foi de 0,99995, dentro do exigido, que é o mínimo de 0,99 [63]. A

¹BRAIN, K. R. Accumulation of L-dopa in cultures from *Mucuna pruriens*. **Plant Sci. Lett.**, v. 7, p. 157-161, 1976

²SZABO, N. **Mucuna news**, april, second issue, 2001

³MYHRMAN, R. Forthcoming. Detection and removal of L-dopa in the legume *Mucuna*. In: CIDICCO, 2000, Tegucigalpa. **Foods and feed from Mucuna: current uses and the way forward**. Tegucigalpa: 2000.

⁴St-LAURENT, L. *et al.* Forthcoming. Variation in L-dopa concentration in accessions of *Mucuna pruriens* (L.) DC var. utilis (Wall. Ex Wight) Baker ex Burck. and in *M. brachycarpa* Rech. In: CIDICCO, **Foods and feed from Mucuna**. Tegucigalpa: 2000.

equação da reta foi $Y = 1,0061 \cdot 10^3 X + 8,9010 \cdot 10^2$ (fig. 12) e o DPR% foi de 5,869%.

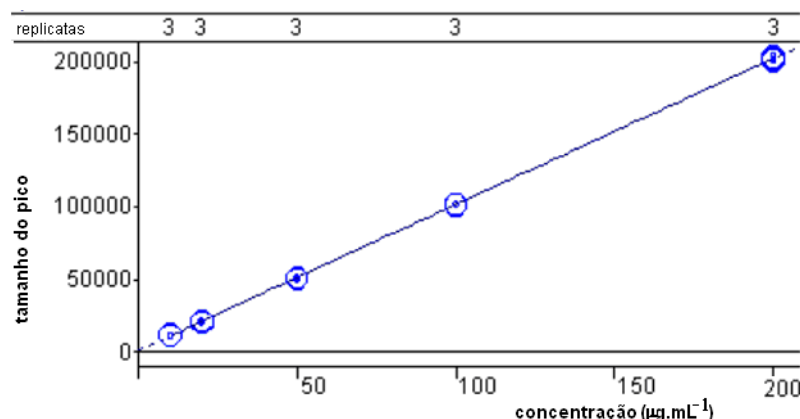


FIGURA 12 - CURVA ANALÍTICA DA LEVODOPA

Entre os pontos, o K' foi em média 2,5; o N foi em torno de 2700 e o $T_{5\%}$ até o ponto 4 ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) esteve abaixo de 1,93. Somente no ponto 5 ($200 \mu\text{g.mL}^{-1}$), o $T_{5\%}$ foi igual a 2,39. Os itens estão dentro do recomendado, com exceção do caudamento no último ponto, que deveria ser inferior a 2 [72]-[76]. Provavelmente isso ocorreu porque a levodopa está em equilíbrio entre as formas mais e menos ionizadas (pH 3) na fase móvel e, em maior quantidade, há maior interação com a fase estacionária com aumento no caudamento.

4.1.3 Definição da exatidão do método

A exatidão avalia a proximidade dos resultados em relação ao valor verdadeiro [75][76], sendo que a recuperação em % avalia quanto foi encontrado em relação a esse valor. Já a medida de erro relativo apresenta quão distantes os resultados estão do valor verdadeiro. Como não foi possível obter amostras com todos os componentes do vegetal exceto a levodopa (a matriz de extração é a semente), optou-se por adicionar massas definidas de levodopa grau farmacêutico (“padrão”) à massas conhecidas de pó de mucuna preta [76]. O teor de levodopa “padrão” (15,0 mg) foi de $98,3 \pm 2,19\%$ (DP=1,47). O teor de levodopa em mucuna preta foi de $4,28 \pm 0,0875\%$ (DP=0,0590). As massas de levodopa recuperadas são independentes da quantidade de levodopa “padrão” adicionada, ilustrando que a

inserção do padrão ou a matriz usada não interferem na recuperação, portanto há eficiência na recuperação. Calculando-se a recuperação de levodopa “padrão” nas diferentes massas (24,0; 18,0 e 12,0 mg), após a exclusão da levodopa advinda da mucuna preta, percebeu-se que as recuperações não foram significativamente diferentes entre si no teste F ($p=0,641$), indicando que a metodologia também seria provavelmente precisa.

A recuperação da levodopa “padrão” foi de 103% (DP = 8,94, ER% = -3,35%) para a adição de 12,0 mg; 101% (DP = 6,54, ER% = -0,950%) para 18,0 mg; e de 98,2% (DP = 1,83, ER% = 1,88%) para 24,0 mg (fig. 13), sendo o método considerado exato.

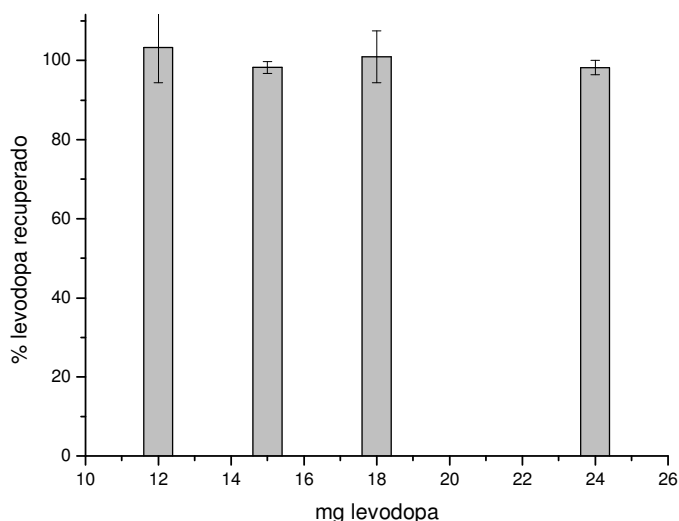


FIGURA 13 - RECUPERAÇÃO DA LEVODOPA “PADRÃO” TESTADA (15 mg) E EM TRÊS CONCENTRAÇÕES COM PÓ DE MUCUNA PRETA (12, 18 E 24 mg)

4.1.4 Definição da precisão do método

Um método é dito preciso quando os dados avaliados estão próximos, em medidas de amostragem múltipla. A repetibilidade é a concordância entre resultados em curto período de tempo com o mesmo analista e instrumentação. As concentrações de pó, avaliadas com o teste F , não tiveram diferença significativa entre si ($p=0,258$), com DPR% menor que 5%. Isso significa que a metodologia é precisa e apresenta repetibilidade (tab. 2). Na avaliação a 100% da concentração teórica do teste, confirmou-se a repetibilidade pois as análises ($n=6$) tiveram DPR% inferior a 5% [63].

TABELA 2 - TEOR DE LEVODOPA EM DIFERENTES MASSAS DE PÓ DE MUCUNA

<i>Repetibilidade</i>	<i>Massa de pó (mg)</i>	<i>Teor de levodopa (%)</i>	<i>DP</i>	<i>DPR%</i>
Três concentrações diferentes (n=3)	40	4,1565 ± 0,1408	0,0945	2,2740
	50	4,1339 ± 0,0453	0,0304	0,7364
	60	4,1717 ± 0,0822	0,0552	1,3236
100% da concentração teórica (n=6)	50	4,2815 ± 0,0475	0,0451	1,0527

4.1.5 Definição da robustez do método

O maior desafio da quimiometria é proporcionar o uso eficiente do tempo e do instrumento, para que resultados mais eficientes sejam obtidos [90]. Um dos problemas mais comuns é determinar a influência de uma ou mais variáveis sobre uma variável de interesse [87] e suas correlações, proporcionando efeitos sinérgicos e antagônicos [85]. Na robustez, as condições de desafio devem simular as que serão encontradas durante as análises [91]. Nessas condições, os picos de interesse devem estar separados, com R , $T_{5\%}$ e K' adequados. Nas análises, mais de uma alteração pode surgir, justificando o estudo de robustez por planejamento fatorial, pela análise de R , $T_{5\%}$ e K' . A matriz de contrastes está representada na tab. 3.

TABELA 3 – MATRIZ DE CONTRASTES RELATIVA A ROBUSTEZ DO SISTEMA CROMATOGRÁFICO NA SEPARAÇÃO DA LEVODOPA EM MUCUNA

Amostras	Fluxo	Fase móvel
	0,8 mL.min ⁻¹ (-) ou 1,2 mL.min ⁻¹ (+)	77 %(-) de água ou 83 (+) % de água
1	-1	-1
2	1	-1
3	-1	1
4	1	1
pc1	0	0
pc2	0	0
pc3	0	0

Legenda: pc1, pc2 e pc3 são replicatas do ponto central, nas condições: 1 mL.min⁻¹ e 80% de água em metanol

Com relação ao K' , avaliado por planejamento fatorial (fig. 14 e 15), se o fluxo sobe de 0,8 para 1,2 mL.min⁻¹, a levodopa diminui seu tempo de retenção. Geralmente, quando se aumenta o fluxo, o tempo de retenção diminui. Quando, na fase móvel, a água aumenta de 77 para 83%, o tempo de retenção aumenta, pois aumenta a polaridade da fase móvel e a substância tem mais afinidade com a fase estacionária. O ideal é que o K' seja maior que 2 [72] ou entre 2 e 10 [73].

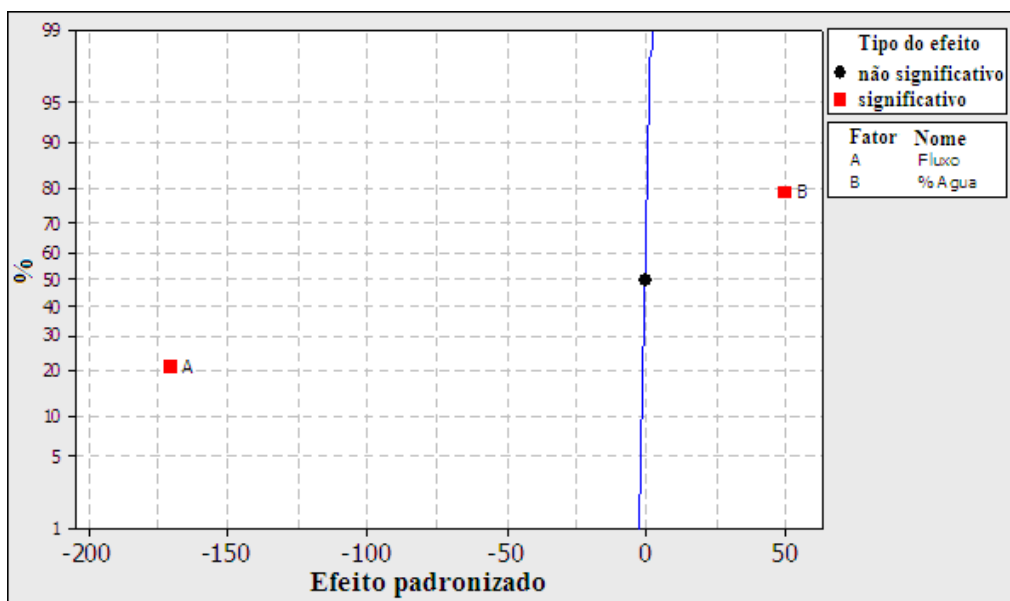


FIGURA 14 - GRÁFICO NORMAL DOS EFEITOS DE FLUXO E COMPOSIÇÃO DE FASE MÓVEL, NA SEPARAÇÃO DE LEVODOPA EM MUCUNA, EM RELAÇÃO A K' ($\alpha = 0,05$) (ROBUSTEZ)

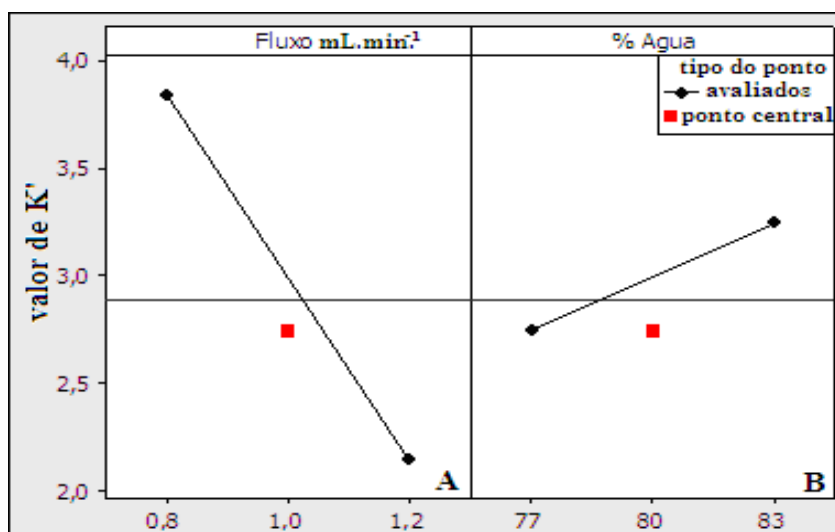


FIGURA 15 - GRÁFICOS DOS EFEITOS PRINCIPAIS “FLUXO” (A) E “FASE MÓVEL” (B) NA SEPARAÇÃO DE LEVODOPA EM MUCUNA, EM RELAÇÃO A K'

A mudança na fase móvel não alterou significativamente o $T_{5\%}$, mas a mudança no fluxo diminuiu o $T_{5\%}$ (fig. 16 e 17). Apesar disso, os valores de $T_{5\%}$ estão dentro do recomendado ($T_{5\%} \leq 2$) [72].

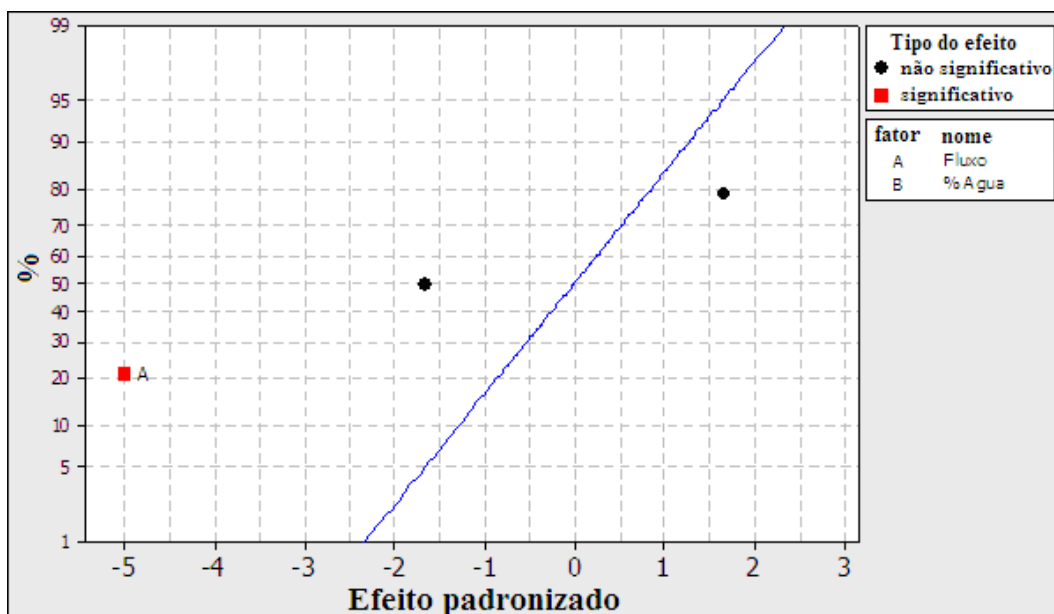


FIGURA 16 - GRÁFICO NORMAL DOS EFEITOS FLUXO E COMPOSIÇÃO DE FASE MÓVEL, NA SEPARAÇÃO DE LEVODOPA EM MUCUNA, EM RELAÇÃO A $T_{5\%}$ (%) ($\alpha = 0,05$) (ROBUSTEZ)

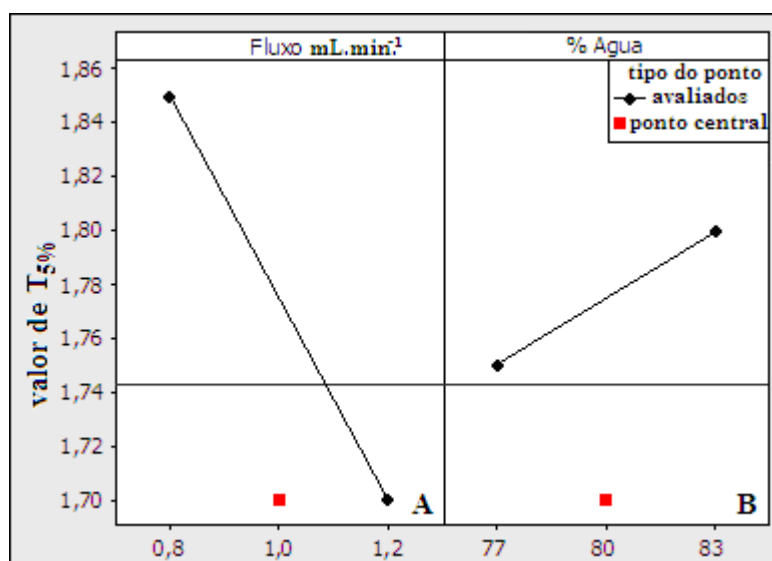


FIGURA 17 - GRÁFICOS DOS EFEITOS PRINCIPAIS “FLUXO”(A) E “FASE MÓVEL”(B) NA SEPARAÇÃO DE LEVODOPA EM MUCUNA EM $T_{5\%}$

Com relação à R, quando o fluxo aumentou de 0,8 para 1,2 mL.min⁻¹, a R dos picos diminuiu. Como K' também diminuiu no aumento de fluxo, isso é explicado pois a resolução é a razão entre a diferença de tempo de retenção entre dois picos adjacentes pela média entre as larguras das bases dos mesmo picos [92]. Foi percebido um aumento de R quando houve um aumento da água na fase móvel de

77 para 83%. Um efeito de 2ª ordem foi visto, quando ambas as variáveis aumentam seus níveis, aumentando R (fig. 18 e 19). Apesar dos efeitos significativos, todas as resoluções foram aceitáveis, visto que o recomendado é $R > 2$ [72].

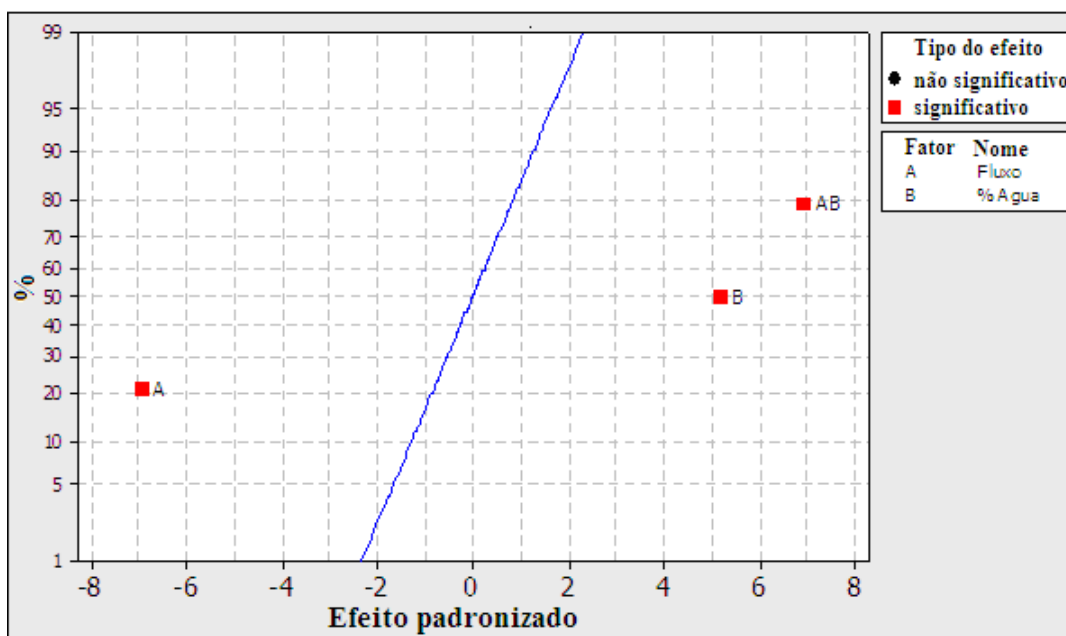


FIGURA 18 - GRÁFICO NORMAL DOS EFEITOS DE FLUXO E COMPOSIÇÃO DE FASE MÓVEL, NA SEPARAÇÃO DE LEVODOPA EM MUCUNA, EM RELAÇÃO A R (%) ($\alpha = 0,05$) (ROBUSTEZ)

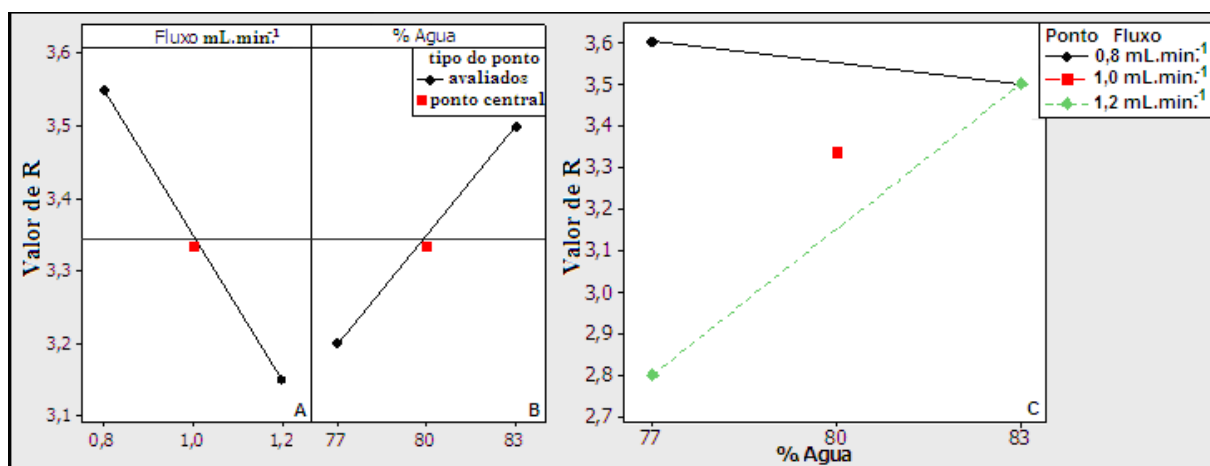


FIGURA 19 - GRÁFICOS DOS EFEITOS PRINCIPAIS “FLUXO” (A) E “FASE MÓVEL” (B) E DE INTERAÇÃO (C), NA SEPARAÇÃO DE LEVODOPA EM MUCUNA, EM R

Considerando os resultados obtidos, percebe-se que o método é robusto com relação ao fluxo e composição de fase móvel, dentro dos limites avaliados (fluxo de 0,8 a 1,2 mL.min⁻¹; fase móvel contendo 77% a 83% de água em metanol).

O uso do planejamento fatorial na definição e validação de métodos de extração e/ou cromatográficos ainda é pequeno. Alguns exemplos incluem a avaliação da robustez com planejamento fatorial e ponto central, na determinação de epicatequina e catequina por CLAE [93] ou ainda no preparo de soluções extrativas aquosas das folhas de: *Bauhinia monandra* Kurz, Caesalpiniaceae [94] e *Phyllanthus niruri* L., Euphorbiaceae [95][96] para quantificar flavonóides totais; e *Psidium guajava* L., Myrtaceae [97] para quantificar taninos totais, todos por UV.

4.2 Determinação dos teores de levodopa em variedades de mucuna

4.2.1 Doseamento da levodopa em variedades de mucuna

Dentre as variedades, a que apresentou o maior teor de levodopa foi a mucuna cinza, seguida da preta e da verde (tab. 4).

Dados de outros autores indicam teores de várias espécies de *Mucuna* entre 1,5% - 8,37% [98][105] e, especificamente 3,65 a 7,81% para a *M. pruriens* [99]-[101]. Dados sobre teores de levodopa em espécimes de *M. utilis*, coletadas na África, Índia e América, indicaram que as plantas advindas das regiões entre 10' da linha do equador apresentam teores muito maiores em levodopa do que as cultivadas em regiões mais distantes do equador (Lorenzetti⁵ et al. apud [104]).

TABELA 4 - TEORES DE LEVODOPA EM PÓS DE GRANULOMETRIA INFERIOR A 0,59 mm EM VARIEDADES DE MUCUNA

Variedade de mucuna	n*	Teor de levodopa - %	DP	DPR%
Verde	5	3,82 ± 0,0311	0,0269	0,705
Preta	5	4,13 ± 0,139	0,120	2,91
Cinza	4	4,61 ± 0,0219	0,0169	0,367

*n = após a aplicação do teste Q

⁵ Lorenzetti, F.; MacIsaac, S.; Arnason, J. T.; Awang, D. V. C.; Buckles, D. (1998) The phytochemistry, toxicology and processing potential of the cover crop velvet bean (Cow(h)age, Cowitch) (*Mucuna* Adans. spp., Fabaceae). In: Buckles D, Et'eka A, Osiname O, Galiba M, Galiano N (eds), **Cover Crops in West Africa. Contributing to Sustainable Agriculture**. Ottawa, Canada: IDRC, pp 67–84.

4.2.2 Influência da granulometria no processo de extração para CLAE

Os resultados da granulometria nas diferentes variedades estão na tab. 5. Observou-se que a maioria do pó se enquadra na granulometria de pó semi-fino.

Ao se analisar as diferentes granulometrias de cada variedade com o teste *t*, observou-se que somente a mucuna cinza apresenta diferença significativa de teor de levodopa para as diferentes granulometrias (tab. 6).

TABELA 5 - PERCENTUAL RELATIVO AO TAMANHO DE PARTÍCULA EM PÓS DE VARIEDADES DE MUCUNA

Variedade de mucuna	Percentual relativo ao tamanho da partícula (%)		
	> 0,590 mm	entre 0,590 e 0,250 mm	< 0,250 mm
Verde	26,47	53,60	19,93
Preta	6,910	62,56	30,53
Cinza	8,690	67,08	24,23

TABELA 6 - GRANULOMETRIA E TEOR DE LEVODOPA EM VARIEDADES DE MUCUNA

Variedade de mucuna	Teor de levodopa %		t obtido (t teórico=1,86)
	Granulometria entre 0,590 e 0,250 mm	Granulometria < 0,250 mm	
Verde	3,68 ± 0,184	3,65 ± 0,0839	0,420
Preta	3,95 ± 0,245	3,97 ± 0,109	0,199
Cinza	4,71 ± 0,152	4,35 ± 0,175	5,30

4.3 Obtenção do extrato seco por Spray Drying

O planejamento de experimentos aplica níveis deliberados em variáveis devidamente escolhidas para estudar seus efeitos em resultados específicos [106]. É evidente que o número de experimentos pode ser muito elevado, mesmo com relação ao fatorial de dois níveis, pois isto depende do número de variáveis avaliadas. Todavia, de maneira geral, as interações de ordem alta (terceira, quarta ou superiores) são de valores menores e podem ser confundidas com o desvio padrão dos efeitos. Se esses efeitos não são significativos, determinar o seu valor não é motivo para que sejam realizados todos os ensaios de um planejamento completo. Nesse sentido, é possível realizar um planejamento fatorial parcial sem que seja necessária a determinação de todos os parâmetros de interação. É possível diminuir o número de experimentos e determinar os efeitos mais importantes (principais e de segunda ordem). Este tipo de planejamento fatorial é chamado de

Planejamento Fatorial Fracionado ou planejamentos fracionários [87][89].

Existem muitos tipos de planejamentos fracionários descritos [87][88]. Pode-se citar as frações $1/2$, $1/4$, $1/8$, $1/16 \dots 1/2^b$ de um planejamento 2^{k-b} , em que k é o número de variáveis e b é o tamanho da fração. O tamanho da fração influenciará no possível número de efeitos a serem estimados e, conseqüentemente, no número de experimentos necessários [88]. Os fatoriais fracionados mais aplicados são os do tipo 2^{k-1} , e são chamados de "1/2 fatorial" [89]. Certamente há perda de informações quando se realizam os planejamentos fatoriais fracionários. Os efeitos principais são misturados com os efeitos de interação e esta contaminação aumenta entre as interações, quando se aumenta a fração do planejamento [88]. Então, nesse caso, um planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} com ponto central ($n=3$) foi executado para a obtenção de extratos secos, avaliando-se mudanças no método de extração, para a diminuição de interferentes (proteínas e fibras) e aumento do teor de levodopa na matéria-prima. A matriz de contrastes está na tab. 7.

TABELA 7 - MATRIZ DE CONTRASTES DA OTIMIZAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO EXTRATO SECO POR *SPRAY DRYING*

Amostras	Velocidade da hélice	Força de centrifugação	Tempo de centrifugação	Tempo de agitação
	288 rpm (-) ou 1200 rpm (+)	1800 g (-) ou 3600 g (+)	5 min (-) ou 10 min (+)	10 min (-) ou 30 min (+)
1	-1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1	1
3	-1	1	-1	1
4	1	1	-1	-1
5	-1	-1	1	1
6	1	-1	1	-1
7	-1	1	1	-1
8	1	1	1	1
pc1	0	0	0	0
pc2	0	0	0	0
pc3	0	0	0	0

Legenda: pc1, pc2 e pc3 são replicatas do ponto central, nas condições: 744 rpm por 20 min em agitação e 2700 g a 7,5 min de centrifugação

Com relação aos experimentos realizados, obteve-se um efeito de 1ª ordem com a força de centrifugação: quanto maior a força, menor foi o rendimento de levodopa (fig. 20). Esperava-se o contrário, visto que maior força depositaria mais proteínas, proporcionando um extrato com menos interferentes. Como a concentração de levodopa nos extratos líquidos (entre 1,59 e 1,69 mg.mL⁻¹) está

próxima do limite de solubilidade ($1,65 \text{ mg.mL}^{-1}$), ocorreu provavelmente a precipitação da mesma, diminuindo o seu rendimento. Pode também ter ocorrido uma interação entre as proteínas e fenóis, diminuindo o rendimento de levodopa.

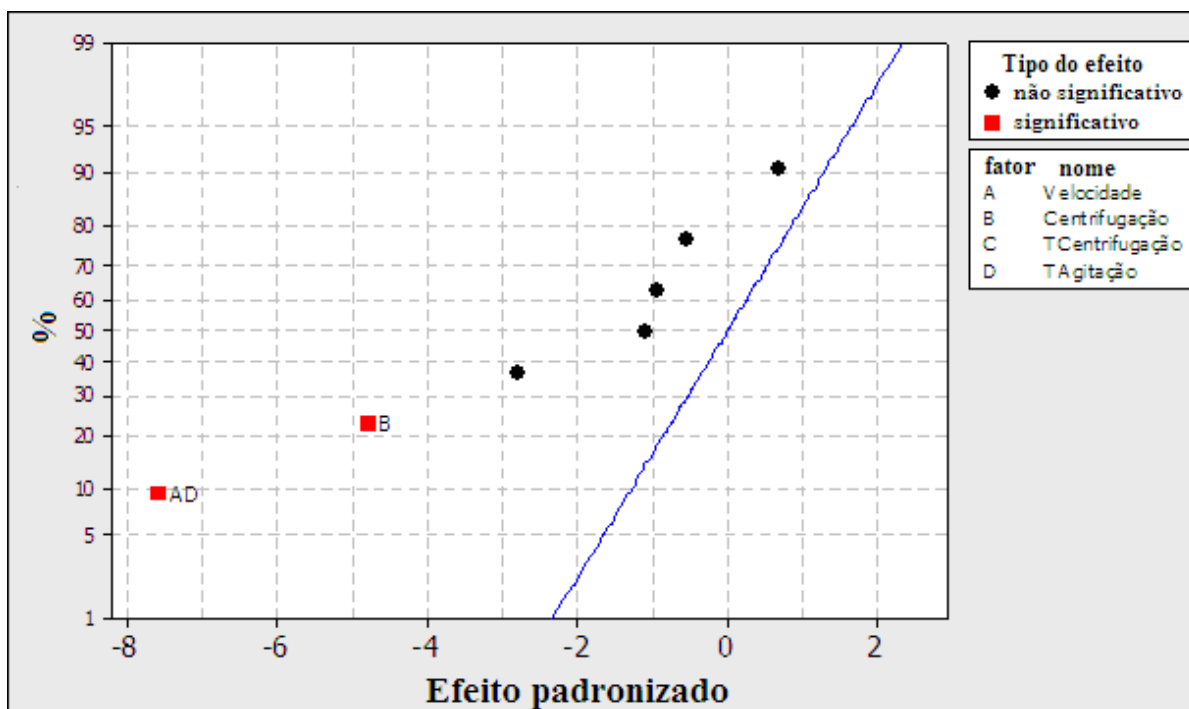


FIGURA 20 - GRÁFICO NORMAL DOS EFEITOS EM RELAÇÃO AO TEOR DE LEVODOPA NO EXTRATO ATOMIZADO ($\alpha = 0,05$)

Foi obtido um efeito de 2ª ordem entre o tempo de agitação e a velocidade da hélice: quando seus valores aumentaram (agitação mais rápida com maior tempo) há queda no rendimento (fig. 21); pode ter ocorrido a oxidação da levodopa, pelo meio aerado (maior agitação) ou por maior tempo de exposição. Pode também ter ocorrido uma interação entre as proteínas e fenóis, diminuindo o rendimento de levodopa. Nesse caso, a amostra que apresentou os melhores resultados foi a amostra 5.

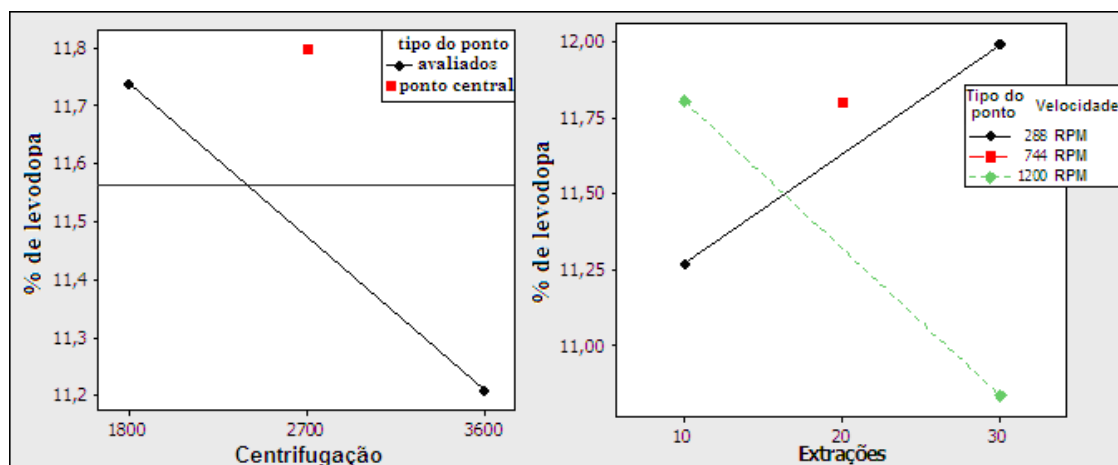


FIGURA 21 - GRÁFICOS DO EFEITO PRINCIPAL “CENTRIFUGAÇÃO” (A) E DE INTERAÇÃO ENTRE “VELOCIDADE” E “TEMPO DE AGITAÇÃO” (B) NO EXTRATO ATOMIZADO EM RELAÇÃO AO TEOR DE LEVODOPA (%)

4.3.1 Determinação do peso seco

A medida do peso seco permite estimar o rendimento do extrato atomizado. Isso é importante, pois o extrato atomizado é higroscópico, o que dificulta sua retirada do equipamento. Além disso, no processo ocorrem perdas de partículas na exaustão do gás de secagem. Os resultados do peso seco da 1ª extração indicaram que não há influência das variáveis na quantidade de massa do extrato seco estimado (fig. 22). A matriz de contrastes está na tab. 7.

O peso seco dos extratos, rendimentos estimados do extrato seco e teor de levodopa estimado (a partir do teor do extrato líquido antes da atomização) estão na tab. 5. A 2ª extração não teve rendimentos que compensassem sua atomização. Se a 2ª extração fosse somada à 1ª, a massa dos extratos secos não aumentaria mais do que 16%. Nesse caso, a amostra 2 (obtida com 1200 rpm, 30 min; 1800 g, 10 min) teria maior massa de extrato atomizado. Porém, maior massa não significa que a amostra terá mais levodopa, pois essa pode ter uma concentração maior de carboidratos e/ou proteínas, aumentando a massa final e diminuindo o teor de levodopa – isso foi comprovado também na amostra 2 (tab. 8 e 9).

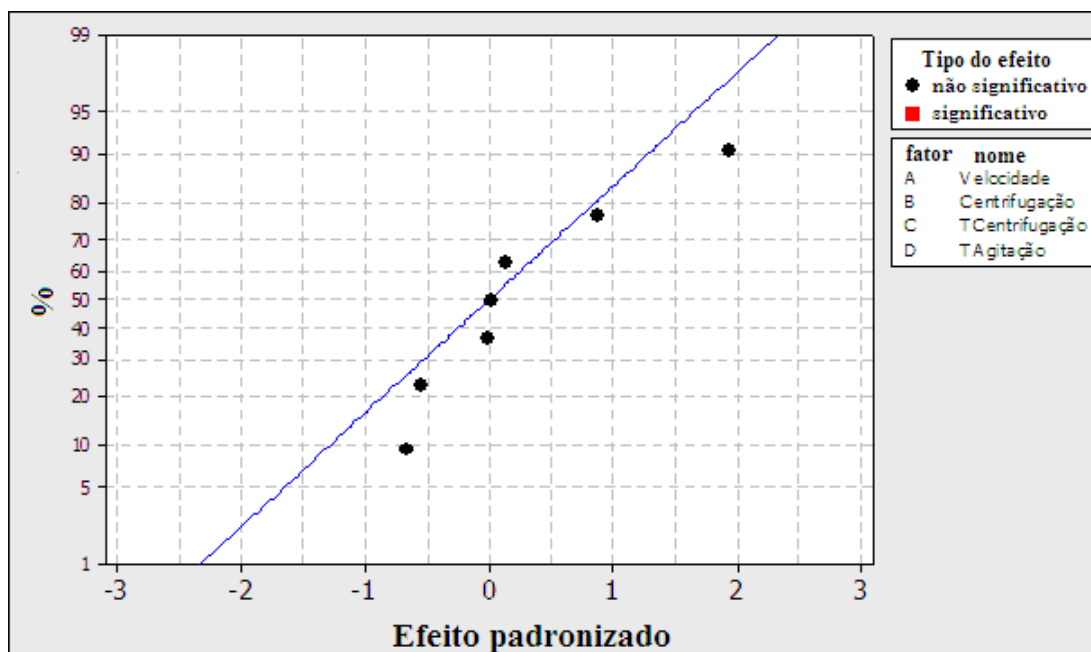


FIGURA 22 - GRÁFICO NORMAL DOS EFEITOS DO EXTRATO ATOMIZADO EM RELAÇÃO AO PESO SECO ($\alpha = 0,05$)

TABELA 8 - VALORES OBTIDOS DE PESO SECO E RENDIMENTOS ESPERADOS

Amostras	1ª extração			2ª extração		
	Peso seco (g.100 mL ⁻¹)	Extrato seco estimado (g)	Teor de levodopa estimado (%)	Peso seco (g.100 mL ⁻¹)	Extrato seco estimado (g)	Teor de levodopa estimado (%)
1	1,1956	3,0845	13,834	0,10220	0,2637	8,7266
2	1,3344	3,4429	12,104	0,20221	0,5217	3,4990
3	1,2900	3,3282	12,348	0,20110	0,5189	3,2775
4	1,2289	3,1705	13,726	0,071101	0,1835	11,110
5	1,3167	3,3970	12,674	0,19891	0,5131	3,9667
6	1,2689	3,2737	13,245	0,09670	0,2494	7,3829
7	1,1522	2,9727	14,218	0,03002	0,0774	16,357
8	1,3044	3,3655	12,286	0,04003	0,1032	23,784

4.3.2 Doseamento dos extratos antes e depois da atomização

Com os valores de extrato seco estimado na 1ª e 2ª extração, foi possível averiguar o que ocorreria se as massas das duas extrações fossem somadas. Foi verificado que o teor de levodopa, na maioria dos casos, diminuiria, em função do acréscimo do extrato da 2ª extração com pouco teor de levodopa (tab. 9). A 2ª extração possui concentrações baixas de levodopa, favorecendo com que extrato final seja diluído por esse acréscimo da massa da 2ª extração.

TABELA 9 - TEORES DE LEVODOPA ESTIMADOS DAS 1ª E 2ª EXTRAÇÕES

Amostras	Teor de levodopa no extrato seco estimado (%) (1ª extração)	Teor de levodopa no extrato seco estimado (%) na soma das 1ª e 2ª extrações	Perdas (-) e ganhos (+) de levodopa (%)
1	13,834	13,432	- 2,9076
2	12,104	10,972	- 9,3551
3	12,348	11,125	- 9,9080
4	13,726	13,583	- 1,0427
5	12,674	11,531	- 9,0154
6	13,245	12,830	- 3,1331
7	14,218	14,272	+ 0,3817
8	12,286	12,628	+ 2,7841

Pelos valores estimados, a amostra 7 (288 rpm, 10 min; 3600 g, 10 min) deteria o maior teor de levodopa, com ganho no teor na 2ª extração; mas, foi a que perdeu mais levodopa na atomização (tab.). A amostra com a menor perda no processo, pelos cálculos estimados, foi a amostra 5, tendo o maior teor de levodopa, mensurado diretamente no extrato atomizado (do *spray dryer*), advindo da 1ª extração (tab. 10).

TABELA 10 - TEOR DE LEVODOPA NO EXTRATO SECO ESTIMADO E NO ATOMIZADO

Amostras	Teor de levodopa no extrato seco estimado (%) na 1ª extração	Teor de levodopa no extrato atomizado da 1ª extração (%) - real	Perdas de levodopa na atomização (%)
1	13,834	11,412	17,506
2	12,104	11,146	7,9167
3	12,348	11,707	5,1903
4	13,726	11,473	16,412
5	12,674	12,265	3,2281
6	13,245	12,126	8,4502
7	14,218	11,126	21,747
8	12,286	10,526	14,331

Relacionando o teor de levodopa no pó de mucuna preta ($4,13 \pm 0,139\%$, item 4.2.1) com o teor de levodopa no extrato atomizado da amostra 5 (12,265%), percebe-se que a quantidade de levodopa aumentou em torno de 197%. Extratos secos dispersíveis com 3,33% e 4,86%, na dose de 1 g, foram adequados ao tratamento de MP [17][19], com biodisponibilidade e ação semelhante a da levodopa/carbidopa (dose de 200 mg/50 mg) [19]. A opção de uma forma dispersível, como o extrato atomizado, facilita que a levodopa seja absorvida na porção proximal do intestino; atrasos na absorção ocorrem mais com formas farmacêuticas recobertas do que com dispersíveis [19], além de que líquidos são mais fáceis de serem engolidos por pacientes com MP, que geralmente têm

problemas na deglutição. Nesse caso, a melhor forma de obtenção de um extrato atomizado de mucuna preta seria com agitação a 288 rpm por 30 min, seguida de centrifugação a 1800 g, por 10 min.

4.4 Isolamento de levodopa

4.4.1 Análises para identificação de EP201

Os dados seguintes referem-se a EP201, isolado conforme as informações do item 3.4. A massa obtida de EP201 foi de 3,261 g e em CCD apresentou $R_f = 0,4$, igual ao da levodopa, com revelador NP/PEG (fluorescência azulada) ou ninhidrina (mancha vermelha), sem outras manchas. No cromatograma por CLAE, praticamente apareceu um único pico, com tempo de retenção em 3,1 min e igual perfil no UV (fig. 23). Estima-se que EP201 tenha em torno de 91,93% de levodopa, definido por CLAE. Relatos descrevem que a levodopa foi a primeira substância a precipitar quando extratos hidroetanólicos foram concentrados [8][9].

Observa-se, no espectro no infravermelho (fig. 24), que entre 3500 a 2750 cm^{-1} , três bandas são observadas, em bloco. Esses sinais podem ser atribuídos à: vibração de deformação axial de $-\text{NH}_2$ alifática em 3400 cm^{-1} (simétrica) e em 3500 cm^{-1} (assimétrica) (bandas média a fraca); vibração de deformação axial de C-H aromático em 3100 cm^{-1} (banda fraca); e vibração de deformação axial de O-H de COOH entre 3300 e 2600 cm^{-1} (banda forte). O grupo $-\text{NH}_3^+$ detém banda larga e intensa de deformação axial entre 3100 e 2600 cm^{-1} . Um sinal intenso entre 1750 e 1600 cm^{-1} pode ser de deformação axial de carboxilato, seguido de outro sinal intenso em torno de 1600 cm^{-1} , que pode ser atribuído à vibração de deformação angular de N-H de amina primária alifática. Sinais de grande intensidade entre 1500 e 1300 cm^{-1} sugerem vibração de deformação angular no plano de O-H (1420 cm^{-1}) com vibração de deformação angular simétrica fora do plano de C-H (1330 cm^{-1}). Sinais entre 1000 e 800 cm^{-1} podem ser de deformação angular fora do plano de ligações C-H do anel aromático 1,2,4-trissubstituído [107][108].

O espectro de massas obtido apresentou relação massa-carga de 196,1. Esse valor equivale a $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{NO}_4$, que coincide com o valor de massa da molécula de levodopa sem o hidrogênio da carboxila, na forma $[\text{M}-\text{H}]^+$ (fig. 25).

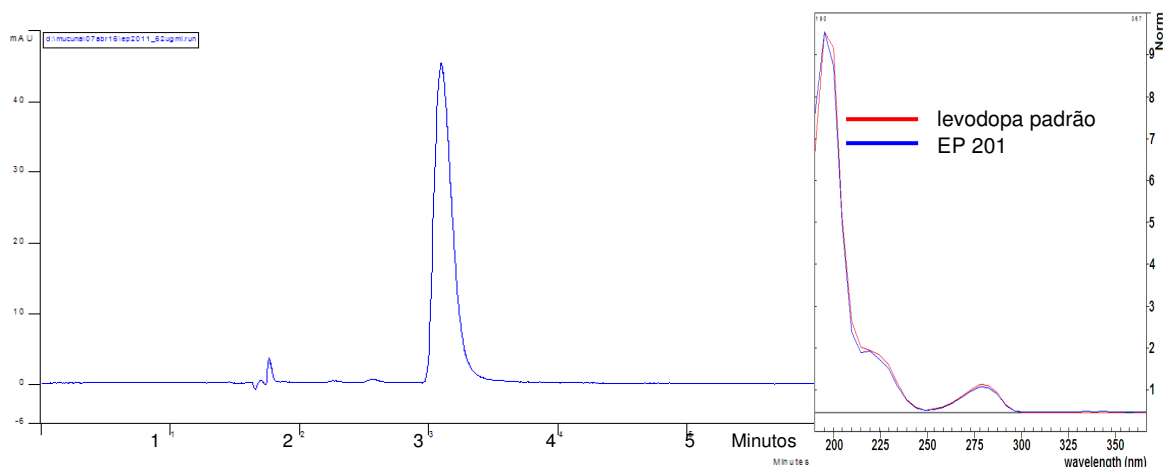


FIGURA 23 - CROMATOGRAMA DE EP201 E ESPECTROS NO UV DO PICO EM 3,1 MIN E DA LEVODOPA PADRÃO

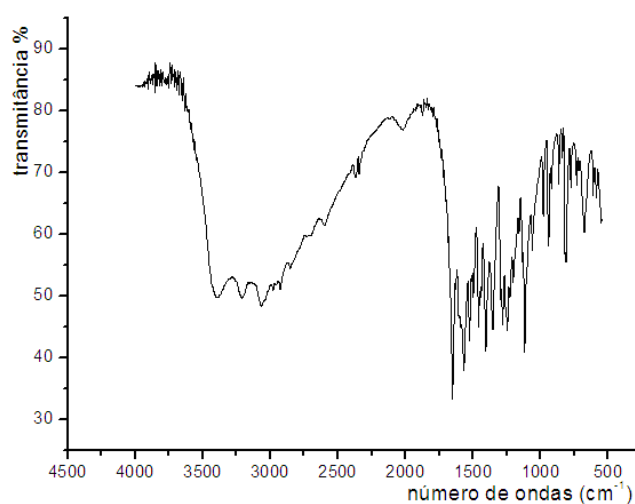


FIGURA 24 - ESPECTRO DA SUBSTÂNCIA EP201 NO INFRAVERMELHO

O espectro de RMN de ^1H em água deuterada apresentou sinais prováveis de: ^1H pertencente a anel aromático (δ 6,64 a 6,50 ppm), ^1H de CH (δ 3,45 ppm), ^1H de CH_2 (δ 2,97 e 2,69 ppm) e ^1H de amina (δ 2,50 ppm). As integrações indicaram oito hidrogênios (fig. 26). Perante a relação massa-carga indicada no espectro de massas, dois hidrogênios não foram visualizados com a integração devida. Isso ocorreu porque esses hidrogênios são de hidroxilas fenólicas, que podem sofrer troca com o deutério. Esses hidrogênios de fenóis, quando em ligação intramolecular de hidrogênio, podem estar entre δ 12,5 a 5,50 ppm. Um pequeno sinal em δ 8,32 ppm foi visto, podendo ser relacionado com os hidrogênios de hidroxilas fenólicas.

*Condições: espectrometria em *turbo spray*, -2500,0 V, *declustering potential* de -50,0 V [M-H]⁺ por infusão, em água:metanol 50:50 (v/v)

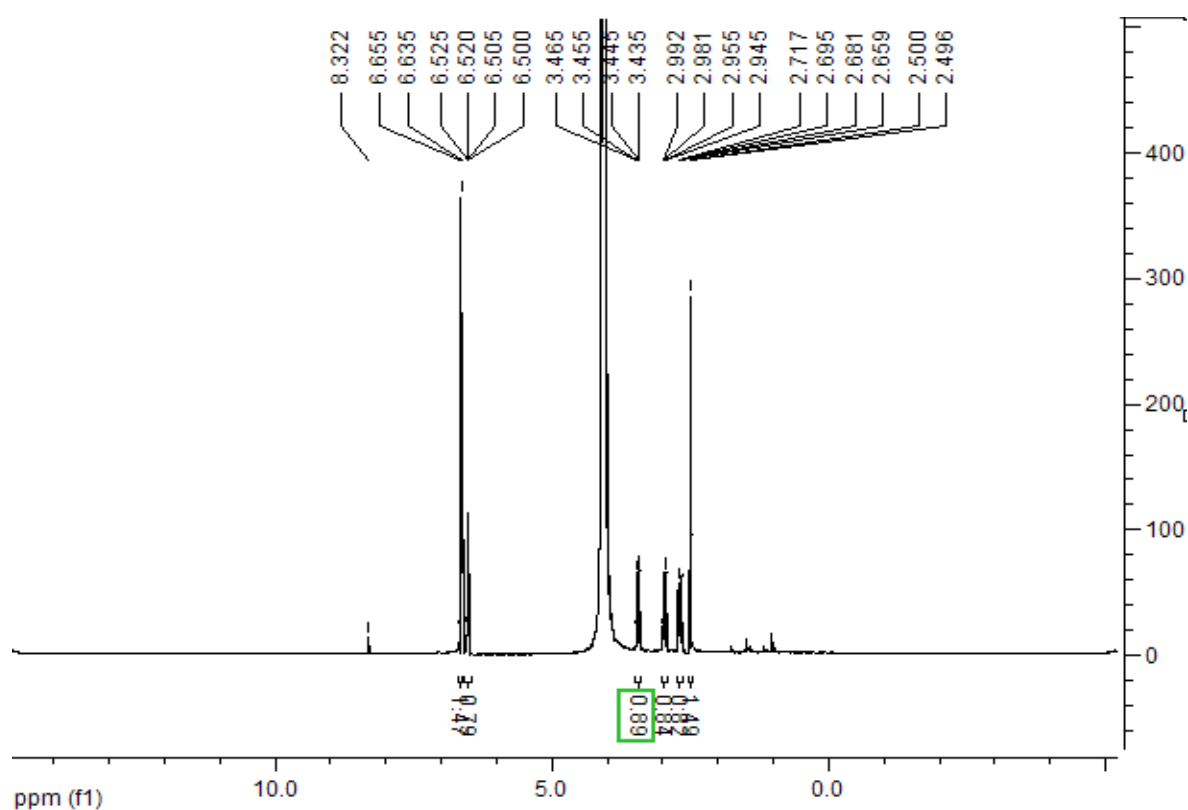


FIGURA 26 - ESPECTRO DE RMN DE ^1H (400 MHz) DA SUBSTÂNCIA EP201 EM ÁGUA DEUTERADA

Os hidrogênios ligados diretamente no anel aromático (δ 6,69 a 6,46 ppm) são três. Isso foi confirmado pela integração ($J=1,47$ em δ 6,70 ppm e $J=0,79$ em δ 6,50 ppm). A literatura afirma que, nessa região, a levodopa pode apresentar um multipletto referente a três hidrogênios (em água deuterada com cloreto de deutério) - δ 6,80–7,05 [109]; ou um dupletto em δ 6,74, um simpleto em δ 6,86 e outro dupletto em δ 6,92 (em água deuterada/ácido fórmico 70:30 com sulfonato de 4,4-dimetil,4-silapentano sódico) para três hidrogênios [110]. No experimento realizado, um conjunto de sinais em torno de δ 6,64 ppm apresentou integração para dois hidrogênios; a literatura cita esses sinais bem resolvidos, como um dupletto e simpleto [110] - provavelmente ocorreu sobreposição de sinais (fig. 27).

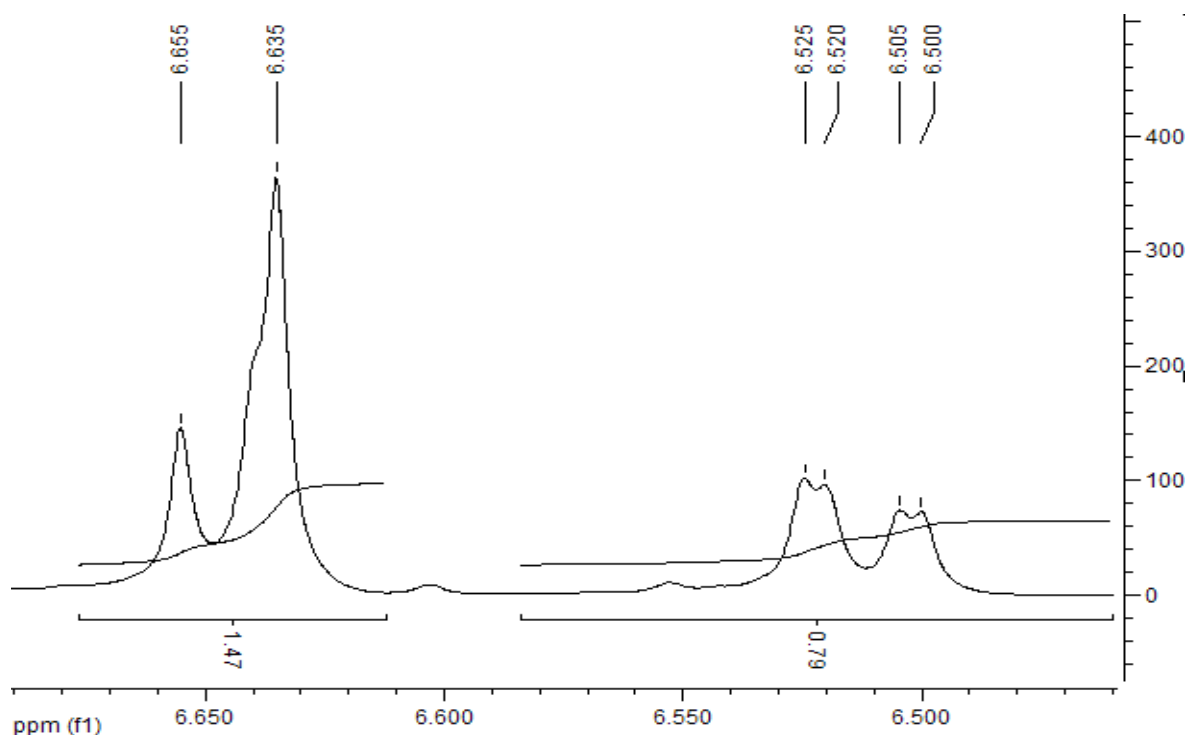


FIGURA 27 - REGIÃO ENTRE δ 6,69-6,46 PPM, DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE EP201, COM SINAIS DE ^1H EM ANEL AROMÁTICO (INTEGRAÇÃO PARA DOIS HIDROGÊNIOS - $J=1,47$ E UM HIDROGÊNIO - $J=0,79$) (ÁGUA DEUTERADA, 400 MHz)

O sinal em torno de δ 6,50 ppm está na forma de dupletto duplo, com acoplamentos de 1,70 Hz e 8,08 Hz. Provavelmente, o acoplamento de 1,70 Hz refere-se a 4J que, no caso da molécula de levodopa, seria entre o Hd e Hf (hidrogênios meta-dirigidos), e o acoplamento de 8,08 Hz refere-se a 3J , entre He e Hf, sendo possível atribuir esse sinal ao Hf (fig. 28).

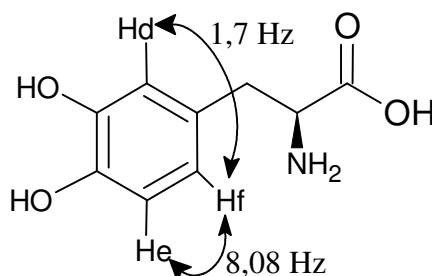


FIGURA 28 – REPRESENTAÇÃO DE ACOPLAMENTOS ENTRE Hf E Hd E ENTRE Hf E He NA MOLÉCULA DE LEVODOPA

O sinal em $\delta 3,45$ ppm apresentou integração para um hidrogênio somente ($\int=0,89$) e multiplicidade de duplete duplo com $J = 4,00$ Hz e $J = 8,00$ Hz (fig. 29). Esses sinais podem ser atribuídos, na molécula de levodopa, ao Ha, hidrogênio do estereocentro, acoplado com Hb e Hc (fig. 30). Conforme a literatura, em 3J , a conformação gauche/sinclinal apresenta uma constante de acoplamento em torno de 1-7 Hz; já a mesma distância de ligações na conformação antiperiplanar apresenta uma constante de acoplamento entre 8-14 Hz [108][111].

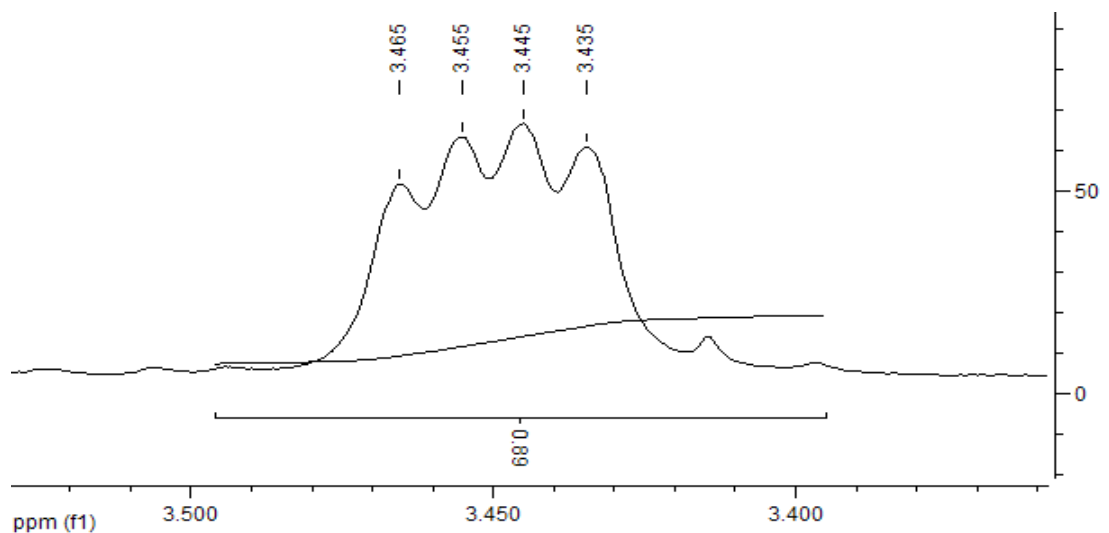


FIGURA 29 - REGIÃO EM $\delta 3,45$ PPM, DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE EP201, COM SINAIS DE ^1H LIGADO AO CARBONO ASSIMÉTRICO (INTEGRAÇÃO PARA UM HIDROGÊNIO - $\int=0,89$) (ÁGUA DEUTERADA, 400 MHz)

Nesse caso, ocorrem constantes de acoplamentos vicinais diferentes para hidrogênios diastereotópicos, devido à diferença de ângulo diedro entre Hb e Hc com relação a Ha.

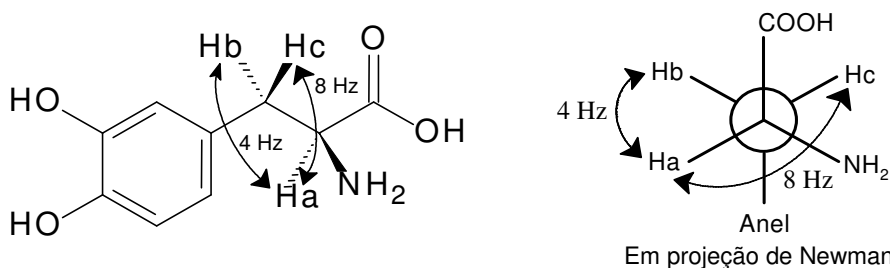


FIGURA 30 - REPRESENTAÇÕES DA MOLÉCULA DE LEVODOPA E ACOPLAMENTOS ENTRE Ha-Hb E Ha-Hc

Em relatos da literatura, a levodopa apresentou sinal em $\delta 4,45$ ppm, na forma de um multipeto com integração para um hidrogênio [109] ou ainda em $\delta 4,34$ ppm, como um dupeto duplo, correspondente a Ha [110]. Em ambos os casos, a integração foi para um hidrogênio. Infelizmente, a literatura não apresentou quais foram as constantes de acoplamento, não sendo possível a comparação com os resultados obtidos. Na molécula de tirosina, análoga à dopa (fig. 45), o sinal do hidrogênio do estereocentro se apresenta em $\delta 4,64$ ppm, com acoplamentos de 4,50 Hz e 8,50 Hz [107], referentes aos hidrogênios diastereotópicos.

O sinal em $\delta 2,97$ ppm apresentou integração para um hidrogênio somente ($\int=0,84$) e multiplicidade de dupeto duplo com $J = 4,08$ Hz e $J = 14,5$ Hz (fig. 31). A constante de acoplamento de 4,08 Hz provavelmente refere-se ao acoplamento entre Hb e Ha, em 3J , na conformação gauche/sinclinal, já citada no sinal em $\delta 3,45$ ppm [108][111]. A constante de acoplamento de 14,5 Hz deve-se provavelmente ao acoplamento entre Hb e Hc, em 2J , ou seja, entre hidrogênios geminais (fig. 32). Então, o sinal em $\delta 2,97$ ppm pode ser atribuído a Hb.

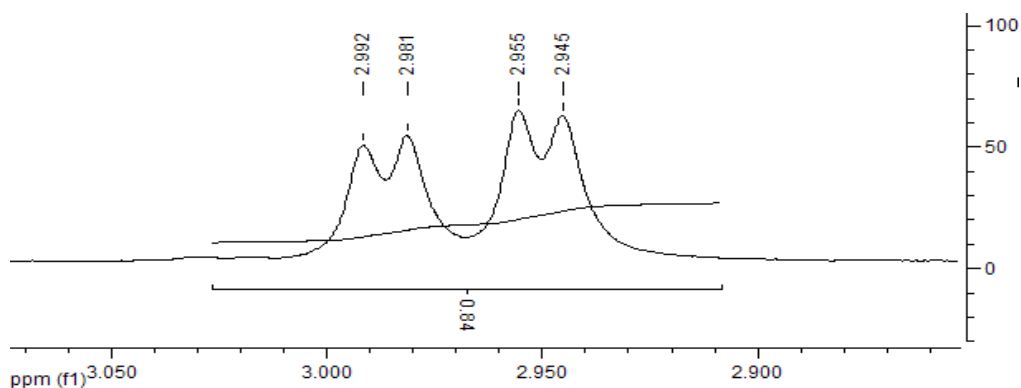


FIGURA 31 - REGIÃO EM $\delta 2,97$ PPM, DO ESPECTRO DE RMN DE ¹H DE EP201, COM SINAIS DE ¹H LIGADO AO CARBONO VIZINHO AO ESTEREOCENTRO (INTEGRAÇÃO PARA UM HIDROGÊNIO - $\int=0,84$) (ÁGUA DEUTERADA, 400 MHz)

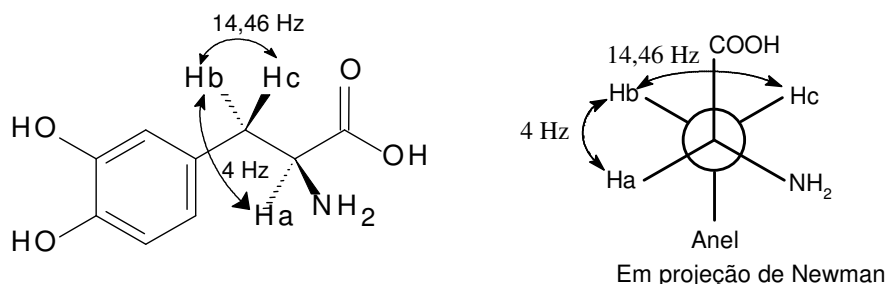


FIGURA 32 - REPRESENTAÇÕES DA MOLÉCULA DE LEVODOPA E ACOPLAMENTOS ENTRE Hb-Ha E Hb-Hc

Esse sinal pode ser comparado ao registrado na literatura, em $\delta 3,50$ ppm com acoplamentos de 6,00 Hz, sinal integrado para um hidrogênio, na forma de duplete duplo [109] ou o sinal relatado em $\delta 3,27$ ppm, na forma de duplete duplo, referente a um hidrogênio diastereotópico [110]. Acoplamentos em 3J , com ângulo diedro de 60° podem variar entre 1-7 Hz, usualmente entre 2-3 Hz em ciclo-hexanos – esses cálculos são aproximados e não levam em conta fatores como substituintes eletronegativos, ângulos de ligação θ ($\angle \text{H-C-C}'$ e $\angle \text{C-C'-H}$) e comprimentos de ligação [108][111]. Na molécula de tirosina (fig. 45), o sinal desse hidrogênio aparece em $\delta 3,60$ ppm, com acoplamentos de 8,50 Hz e 15,0 Hz [107].

O sinal em $\delta 2,69$ ppm apresentou integração para um hidrogênio somente ($\int=0,82$) e multiplicidade de duplete duplo com $J = 8,40$ Hz e $J = 14,4$ Hz (fig. 33). De acordo com os outros sinais relatados, esse deve ser atribuído a Hc, pois o sinal apresenta um acoplamento referente à distância de ligação entre hidrogênios geminais, em 2J (14,4 Hz), com Hb e outro acoplamento referente à distância de ligações em 3J na conformação antiperiplanar (8,40 Hz), com Ha (fig. 34).

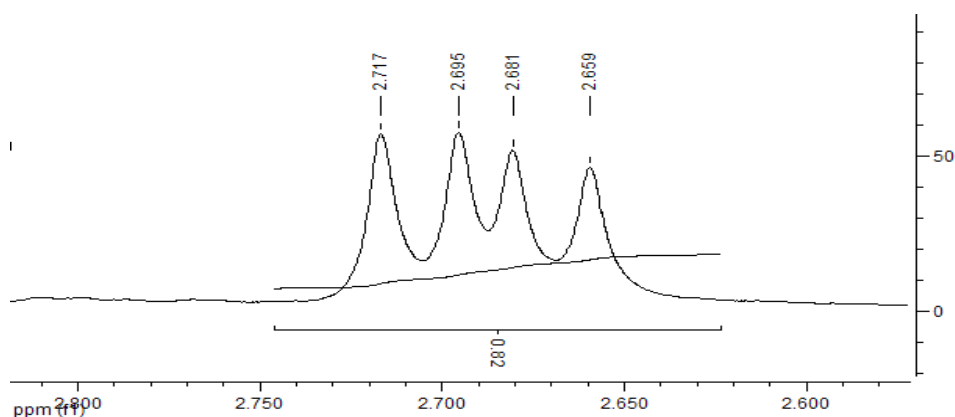


FIGURA 33 - REGIÃO EM $\delta 2,69$ PPM DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE EP201, COM SINAIS DE ^1H LIGADO AO CARBONO VIZINHO AO ESTEREOCENTRO (INTEGRAÇÃO PARA UM HIDROGÊNIO - $\int=0,82$) (ÁGUA DEUTERADA, 400 MHz)

Autores relatam um sinal em $\delta 3,20$ ppm, na forma de duplete duplo com $J = 6,0$ Hz e integração para um hidrogênio; ou ainda um sinal em $\delta 3,12$ ppm, na forma de duplete duplo, correspondente a um hidrogênio diastereotópico [110].

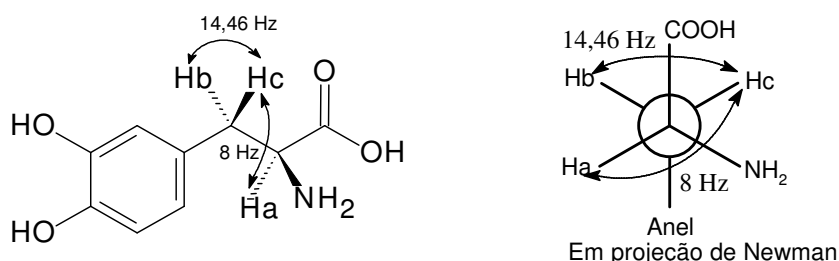


FIGURA 34 - REPRESENTAÇÕES DA MOLÉCULA DE LEVODOPA E ACOPLAMENTOS ENTRE Hc-Ha E Hc-Hb

A integração do sinal em $\delta 2,50$ ppm indica a presença de dois hidrogênios ($\int = 1,49$) (fig. 35). Nessa região, sinais de hidrogênios ligados à amina alifática são visualizados (entre $\delta 3,00$ e $0,50$ ppm). Há troca entre o deutério e os hidrogênios ligados a N e, quanto mais lenta for a velocidade de troca, mais largo será o sinal obtido. Algumas vezes, as absorções largas podem deter “corcundas”, correspondentes ao desdobramento pelo núcleo de nitrogênio [108]. Nesse caso, percebeu-se a formação de “corcundas” no sinal largo em $\delta 2,50$ ppm.

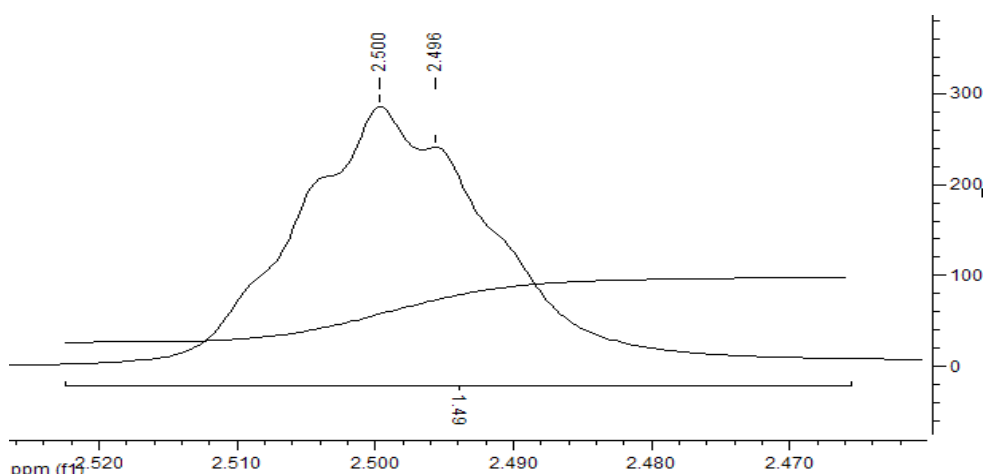


FIGURA 35 - REGIÃO EM TORNO DE $\delta 2,50$ PPM, DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE EP201, COM PROVÁVEL SINAL DOS ^1H DE AMINA, COM INTEGRAÇÃO PARA DOIS HIDROGÊNIOS ($\int = 1,49$) (ÁGUA DEUTERADA, 400 MHz)

A presença de simpleto largo ($\delta 3,60$ ppm), com integração para dois hidrogênios, já foi relatada em artigo [109] e pode ter sido vista em função dos dois

hidrogênios da amina.

Um pequeno sinal, na forma de simpleto, foi visto em δ 8,32 ppm, podendo ser atribuído ao sinal de hidrogênio de fenol em ligação intermolecular. A integração foi muito baixa ($\int=0,13$), que pode ser explicada pelo fato de que hidrogênios de fenóis podem ser trocados pelo deutério (fig. 36). Geralmente hidrogênios de fenóis em ligação intermolecular apresentam sinais entre δ 12,5 a 5,5 ppm [108].

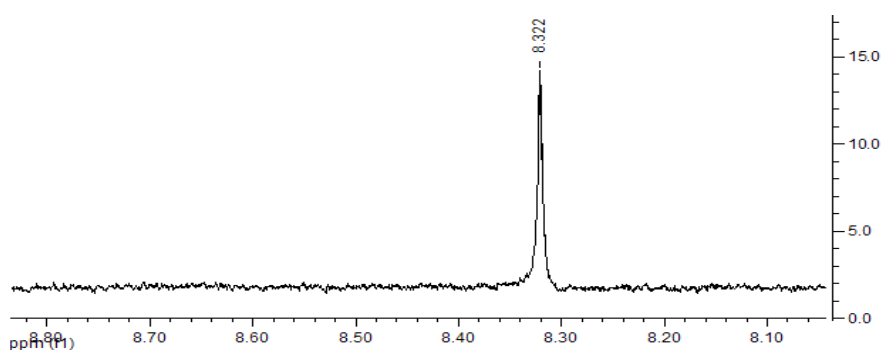


FIGURA 36 - REGIÃO EM δ 8,32 PPM, DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE EP201, SINAL PROVÁVEL DE ^1H DE FENOL ($\int=0,13$) (ÁGUA DEUTERADA, 400 MHz)

Com relação ao espectro de RMN de ^{13}C , esse apresentou nove sinais (fig. 37), além do sinal característico do dimetilsulfóxido, na forma de septeto, em δ 39,4 ppm (fig. 38). Os nove carbonos visualizados coincidem com a fórmula molecular suposta de $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_4$ perante a relação massa-carga de 196 m/z para $[\text{M}-\text{H}]^+$.

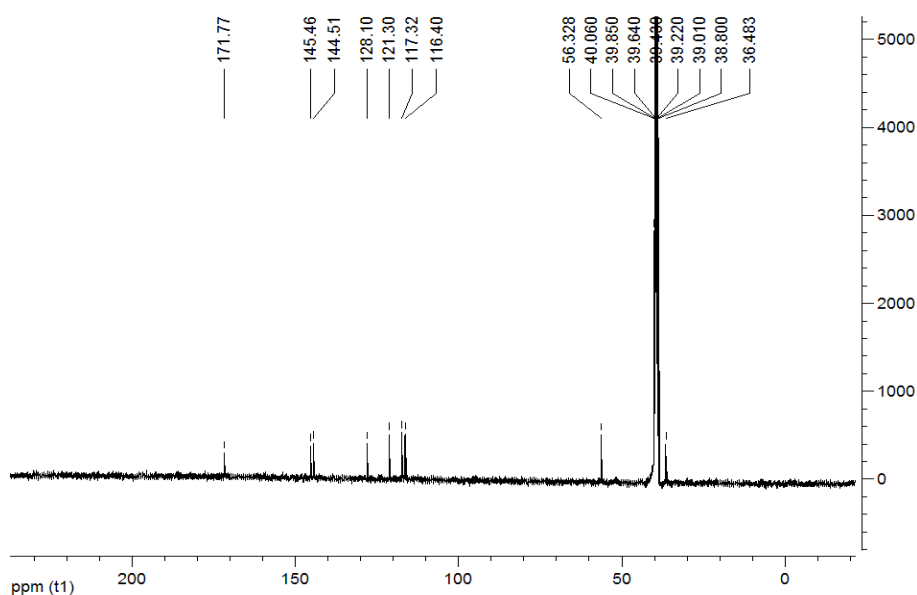


FIGURA 37 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C CONTEMPLANDO OS SINAIS DE EP201 E O SINAL DO $\text{DMSO}-d_6$ EM δ 39,4 PPM ($\text{DMSO}-d_6$, 100 MHz)

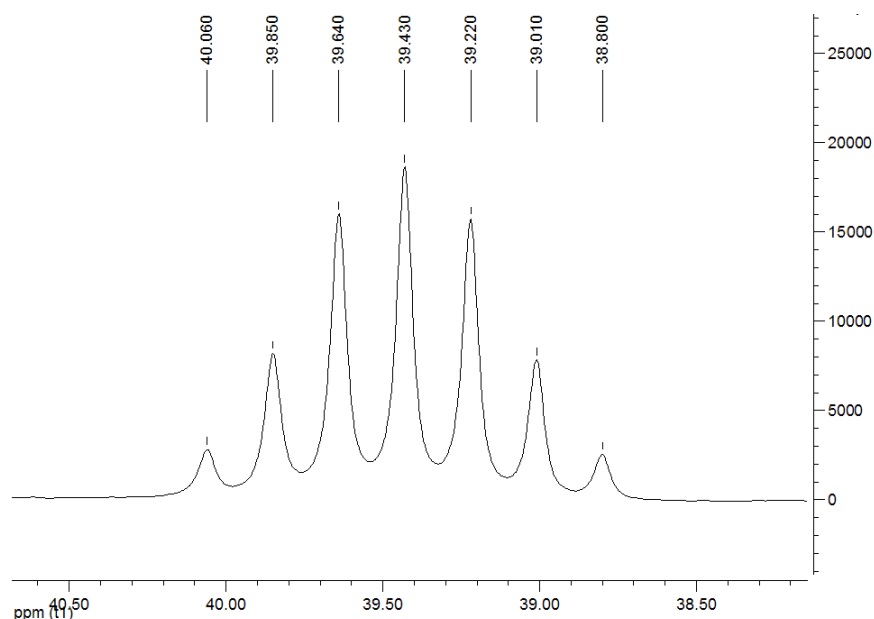


FIGURA 38 - DETALHE DO ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C NA REGIÃO DO SEPTETO CORRESPONDENTE AO SINAL DO $\text{DMSO-}d_6$ (100 MHz)

Na tabela 11 estão elencados os deslocamentos químicos obtidos, possíveis ambientes químicos dos carbonos e deslocamentos químicos publicados em literatura:

TABELA 11 - DESLOCAMENTOS QUÍMICOS OBTIDOS, RELATADOS EM LITERATURA E POSSÍVEIS AMBIENTES QUÍMICOS DE ^{13}C ENVOLVIDOS

Deslocamento químico obtido (δ em ppm)*	Deslocamento químico relatado em literatura (δ em ppm)**	Provável ambiente químico do ^{13}C ***
171,77	164,41	Ácido carboxílico saturado
145,46	147,43	Aromático
144,51	146,47	Aromático
128,10	128,09	Aromático
121,30	123,87	Aromático
117,33	120,20	Aromático
116,40	119,05	Aromático
56,328	60,200	$\begin{array}{c} \\ -\text{CH} \\ \end{array}, \begin{array}{c} \\ -\text{CH}_2 \\ \end{array}, \begin{array}{c} \\ -\text{C}-\text{NR}_2 \\ \end{array}$
36,483	39,730	$\begin{array}{c} \\ -\text{CH} \\ \end{array}, \begin{array}{c} \\ -\text{CH}_2 \\ \end{array}, \begin{array}{c} \\ -\text{C}-\text{NR}_2 \\ \end{array}$

Fonte: * Obtido em $\text{DMSO-}d_6$ com EP201

** Obtido em CDCl_3 [109]

*** Obtido de [107][108]

Com auxílio do espectro de DEPT 135, pode-se inferir alguns carbonos em relação à estrutura de EP201 (fig. 39). Nesse experimento, os sinais de RMN de ^{13}C ligados a um único hidrogênio ou a três hidrogênios aparecem direcionados para cima da linha-base do espectro, os sinais referentes à carbonos ligados a dois

hidrogênios aparecem para baixo e os carbonos que não estão ligados a hidrogênio não são visualizados. Isso acontece visto que o pulso variável de hidrogênio é introduzido em 135° e a intensidade do sinal em um dado momento depende do número de hidrogênios ligados a um determinado átomo de carbono. Subespectros separados são registrados para cada um dos grupos CH_3 , CH_2 e CH , sendo posteriormente condensados em duas linhas, mostrando os sinais de CH_3 e CH para cima e os sinais de CH_2 para baixo [108]. Sobrepondo-se esse espectro (fig. 39) ao espectro de RMN de ^{13}C (fig. 37), percebeu-se que somente cinco sinais aparecem, com exceção do sinal em triplete do $\text{DMSO}-d_6$. Além disso, não há sinal com deslocamento químico entre δ 10 a 30 ppm, confirmando que não há ^{13}C ligado a três hidrogênios. Portanto, há somente um carbono do tipo CH_2 em torno de 36 ppm, quatro carbonos do tipo CH entre δ 56,00 a 121,3 ppm, e por diferença, quatro carbonos não ligados a H.

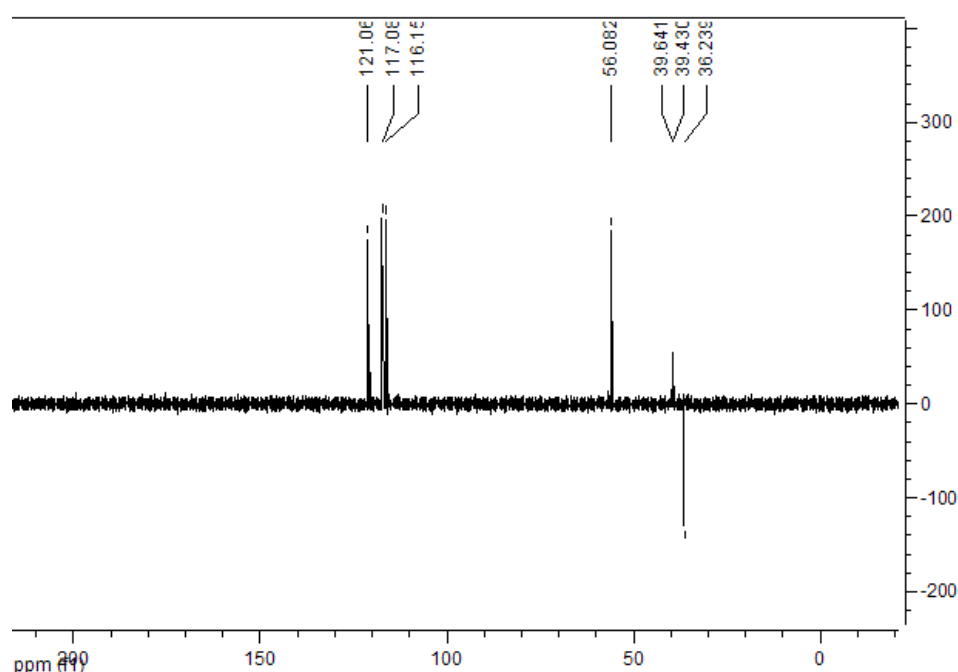


FIGURA 39 - ESPECTRO DEPT 135 DE EP201 ($\text{DMSO}-d_6$, 100 MHz)

Como os resultados anteriores levam a conclusão que a substância isolada é a dopa, perante a numeração dos carbonos na fig. 40, pode-se afirmar que:

- O deslocamento químico de δ 171,77 ppm refere-se a C1 (carbono 1), pois esse deslocamento químico se aplica em estruturas de ácido carboxílico saturado. Isso foi confirmado pelo desaparecimento do sinal em DEPT 135, visto que não detém hidrogênio diretamente ligado;

- Os deslocamentos químicos de δ 145,50 e 144,50 ppm devem ser devidos a C6 e C7, pois átomos de carbonos aromáticos diretamente ligados a OH tem seu deslocamento químico aumentado. Em benzenos monossustituídos, o deslocamento de δ 128,5 ppm aumenta para 155 ppm com a ligação da hidroxila, aproximadamente [108]. O fato desses sinais terem desaparecido no DEPT 135 confirma que são referentes a C sem hidrogênio diretamente ligado;
- O sinal de δ 128,10 ppm se trata de C aromático sem hidrogênio ligado, pela ausência do sinal no DEPT 135. O único C com essas características e que não esteja ligado a hidroxila é o C4;
- Os deslocamentos químicos de δ 121,30 ppm, 117,30 ppm e 116,40 ppm referem-se a C aromáticos com um hidrogênio ligado, conforme o DEPT 135. No caso de C5, seu deslocamento pode ser atribuído a δ 116,40 ppm, pois nos seus carbonos vizinhos há a presença de OH e de CH₂, que “diminuem” o valor do deslocamento químico. O deslocamento de δ 117,3 ppm deve ser atribuído a C8, pois esse apresenta hidroxila no carbono vizinho. Já para C9, a presença de hidroxilas em carbonos de posição *meta* e *para* fornecem um deslocamento químico maior, de δ 121,30 ppm.
- O deslocamento de δ 56,300 ppm poderia ser tanto do C2 quanto de C3; entretanto, pelo DEPT 135, visualiza-se que esse sinal é de C ligado a somente um hidrogênio, atribuindo-se que é o C2.
- Como o caso anterior, o deslocamento de δ 36,483 ppm poderia ser tanto do C2 quanto de C3; entretanto, pelo DEPT 135, visualiza-se que esse sinal é de C ligado a dois hidrogênios, atribuindo-se ao C3.

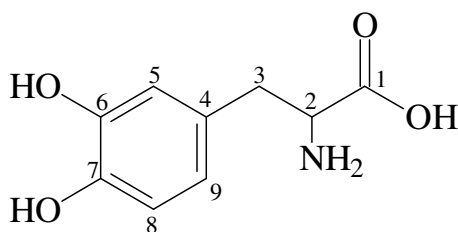


FIGURA 40 - ESTRUTURA DA DOPA

Portanto, confirma-se que a substância isolada EP201 é a dopa, podendo tanto ser a levodopa quanto a dextrodopa. Na grande maioria dos casos, o metabolismo enzimático das plantas origina isômeros *levo*, mas isso não significa

que isômeros dextro não possam se encontrados. Para a confirmação de qual enantiômero se trata, fez-se a separação cromatográfica quiral da substância isolada, visto que métodos de cromatografia comuns não separam enantiômeros facilmente.

4.5 Separação enantiomérica de EP201

4.5.1 Otimização da separação dos enantiômeros da dopa

Os éteres de coroa, primeiramente introduzidos por Pedersen em 1967, são poliéteres macrocíclicos sintéticos que podem formar complexos seletivos com cátions. Éteres de coroa com 18 membros podem gerar complexos relativamente estáveis com íons amônio e compostos com grupo amino primário protonado em um arranjo do tipo tripé (fig. 41); por isso, são usados com sucesso na separação de cátions e compostos com grupo amino (principalmente amino primário), incluindo enantiômeros, especialmente em fases estacionárias para CLAE [53][56][57].

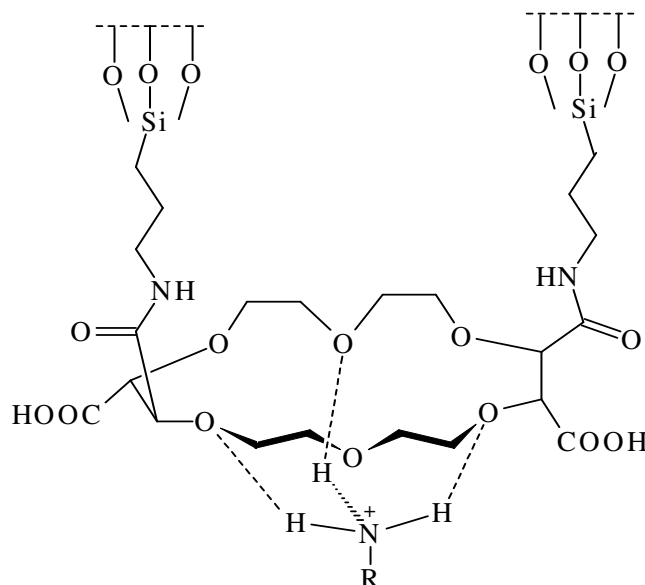


FIGURA 41 - COMPLEXAÇÃO DO SAL DE AMÔNIO PRIMÁRIO NA CAVIDADE QUIRAL DO ÉTER DE COROA, FASE ESTACIONÁRIA CHIROSIL RCA (+)

Fonte: Regis (2009) [112]

Como as fases móveis (citadas em literatura para a separação de dopa em éteres de coroa) variavam muito, optou-se por melhorar a separação por meio de

planejamento fatorial de experimentos, objetivando o melhor resultado de resolução com o tempo mais adequado, podendo, inclusive, serem visualizados efeitos significativos de segunda ordem. Avaliaram-se, portanto, os resultados de acordo com os valores obtidos da resolução – R. Os parâmetros $T_{5\%}$ e K' foram utilizados como auxiliares no processo de escolha.

A matriz de contrastes está na tabela 12. Nesse planejamento não foi utilizado o ponto central, mas o desvio foi obtido por meio das replicatas ($n = 2$) de cada amostra.

TABELA 12 – MATRIZ DE CONTRASTES PARA A OTIMIZAÇÃO DA SEPARAÇÃO DE ENANTIÔMEROS DA DOPA*

Amostra	Fluxo 0,8 mL.min ⁻¹ (-) ou 1,0 mL.min ⁻¹ (+)	Solvente orgânico Acetonitrila (-) ou Metanol (+)	Concentração do solvente orgânico 60% (-) ou 70% (+)
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1

*cada amostra foi trabalhada em duplicata

Na separação dos padrões, percebeu-se a mesma seqüência dos enantiômeros, relatada na literatura, para éteres de coroa [57][113]: primeiramente foi eluída a levodopa (*S*) e, posteriormente, a dextrodopa (*R*) (fig. 42).

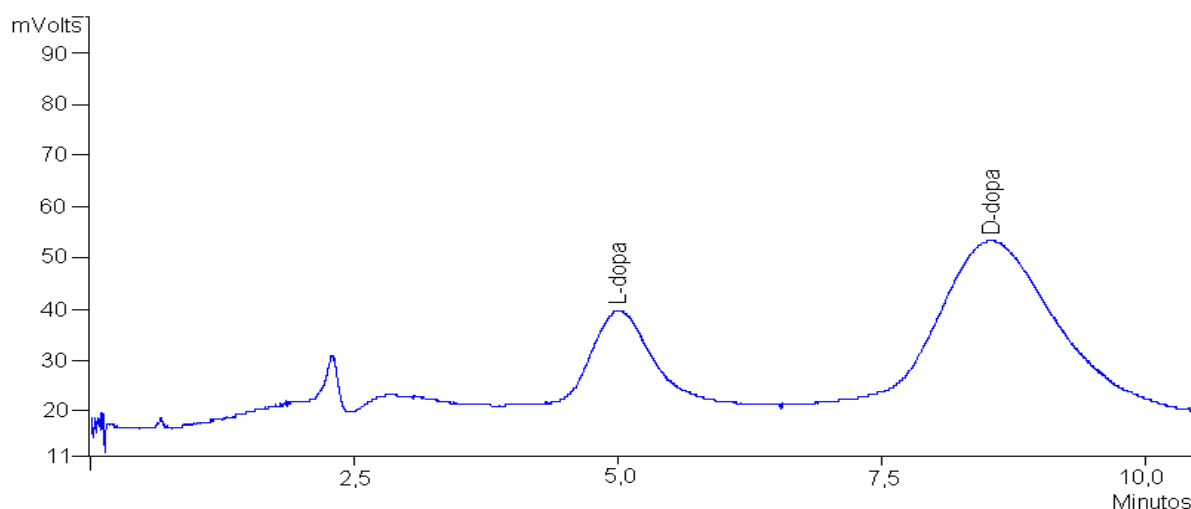


FIGURA 42 - CROMATOGRAMA DA SEPARAÇÃO DOS ENANTIÔMEROS DA DOPA*

*Condições: coluna Chirosil RCA (+), fase móvel metanol:água (70:30, v/v) a 0,8 mL.min⁻¹, detector eletroquímico

Para o reconhecimento quiral, ocorre a complexação do sal de amônio primário do enantiômero (formado pela protonação do α -aminoácido em meio ácido) com a cavidade quiral do éter de coroa [112], por ligações de hidrogênio entre o oxigênio do éter e os hidrogênios do grupo amino (fig. 43).

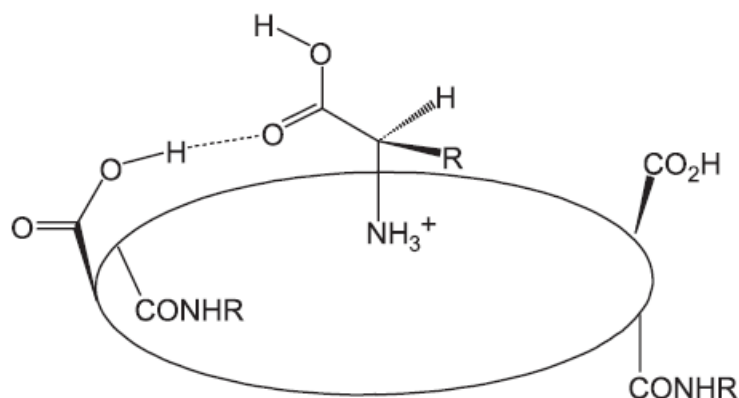
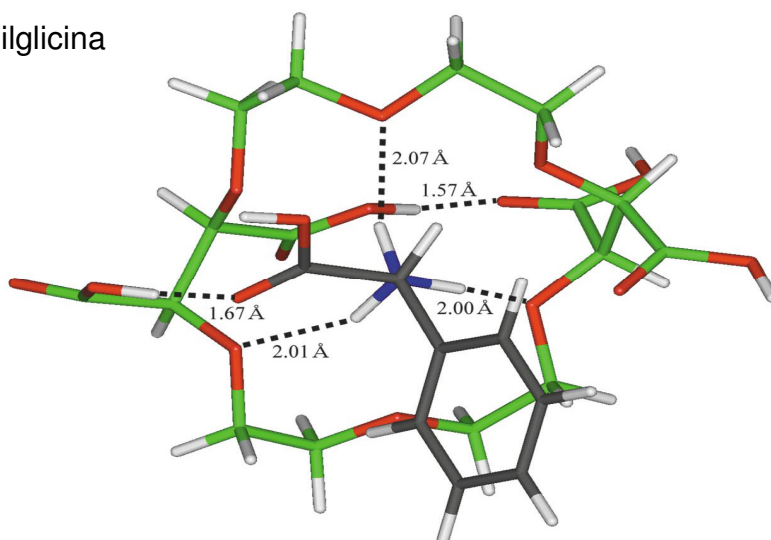


FIGURA 43 - REPRESENTAÇÃO DO RECONHECIMENTO QUIRAL ENTRE FASE ESTACIONÁRIA E O ENANTIÔMERO MAIS FORTEMENTE RETIDO (*R*), COM A LIGAÇÃO DE HIDROGÊNIO ENTRE O HIDROGÊNIO DO ÁCIDO DO ÉTER E O OXIGÊNIO DA CARBONILA DO AMINOÁCIDO

Fonte: LEE, JIN, BAEK (2005) [57]

Essa interação é percebida com os dois enantiômeros. Em estudos usando RMN com moléculas de D e L-fenilglicina, percebeu-se que, somada às ligações de hidrogênio, existe outra ligação com o hidrogênio do ácido carboxílico no éter de coroa e o oxigênio da carboxila do (*R*)-aminoácido, sendo essa nova interação crucial para a separação [57], além de uma interação hidrofóbica entre o anel do éter e a porção fenil do enantiômero [113] (fig. 43 e 44). Relatos em literatura afirmam que uma mistura de enantiômeros com grupo volumoso no carbono β (fenilalanina, triptofano, dopa e tirosina) apresentou alta seletividade em outra fase com éter de coroa, ao passo que uma mistura de aminoácidos sem grupo volumoso no carbono β não teve a mesma seletividade (como isoleucina, valina e treonina) (fig 45); a interpretação foi de que um impedimento estérico esteja ocorrendo na formação dos complexos [54], facilitando assim o processo de separação.

Com D-fenilglicina



Com L-fenilglicina

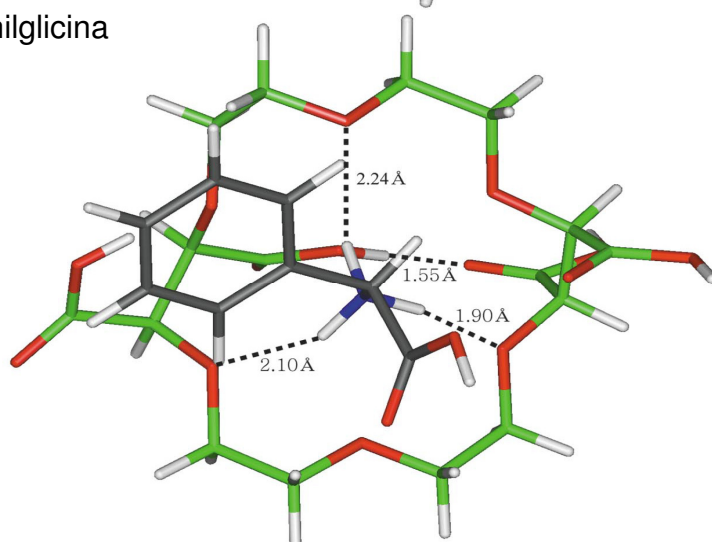


FIGURA 44 - ESTRUTURAS DOS COMPLEXOS COM ÁCIDO (+)-(18-COROA-6)-2,3,11,12-TETRACARBOXÍLICO/ FENILGLICINA (LIGAÇÕES DE HIDROGÊNIO - LINHA PONTILHADA)

Fonte: BANG *et al.* (2001)[113]

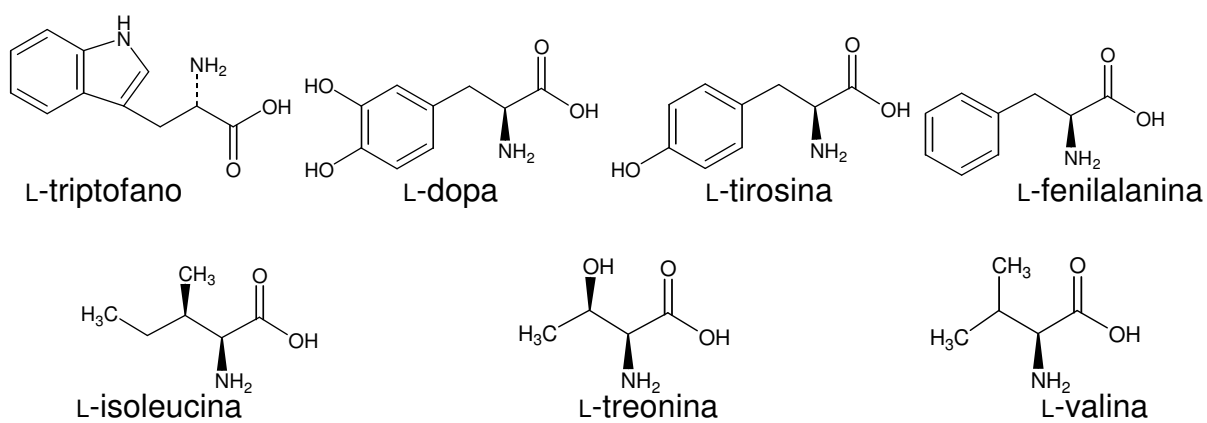


FIGURA 45 - ESTRUTURAS DE ALGUNS AMINOÁCIDOS COM GRUPO VOLUMOSO NO CARBONO β E SEM GRUPO VOLUMOSO

Analizando os resultados obtidos com o planejamento fatorial na otimização da fase móvel, percebeu-se que os parâmetros obtidos de K' e $T_{5\%}$ apresentaram-se próximos do recomendado ($2 < K' < 10$ e $T_{5\%} \leq 2$) [72][73]. Já com relação à R , a amostra 7, que utilizou metanol:água 70:30 (v/v) e fluxo de $0,8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ foi a única com valor de R adequado ($R \leq 2$) (tab. 13), sendo essas condições escolhidas para a separação dos enantiômeros em EP201. Os valores encontrados na literatura do fator de separação entre isômeros de dopa situaram-se entre 1,43 a 2,73 [54]-[57].

TABELA 13 - RESULTADOS DE K'_1 , $T_{5\%}$, R E FATOR DE SEPARAÇÃO DAS SEPARAÇÕES OBTIDAS POR PLANEJAMENTO FATORIAL

Amostras	K'_1	$T_{5\% 1}$	$T_{5\% 2}$	R	Fator de separação
1	2,63	1,11	1,27	1,50	1,43
2	1,94	1,20	1,24	1,35	1,46
3	2,93	1,09	1,11	1,85	1,62
4	2,13	1,27	1,25	1,80	1,69
5	3,91	1,17	1,16	1,60	1,58
6	2,95	1,24	1,30	1,75	1,60
7	3,88	1,30	1,24	2,50	1,85
8	2,78	1,22	1,53	1,95	1,83

K'_1 - fator capacidade da 1ª substância eluída

$T_{5\% 1}$ - caudamento do 1º pico (isômero S)

$T_{5\% 2}$ - caudamento do 2º pico (isômero R)

R - resolução entre os picos dos enantiômeros

Fator de separação = K'_1/K'_2 sendo K'_2 o fator capacidade da 2ª substância eluída

Com relação aos resultados do planejamento fatorial, observou-se efeito significativo de primeira ordem em relação ao tipo de solvente orgânico utilizado e o percentual na fase móvel (fig. 46 e 47). Há uma tendência em aumentar a resolução conforme o fluxo aumenta, mas isso não foi significativo.

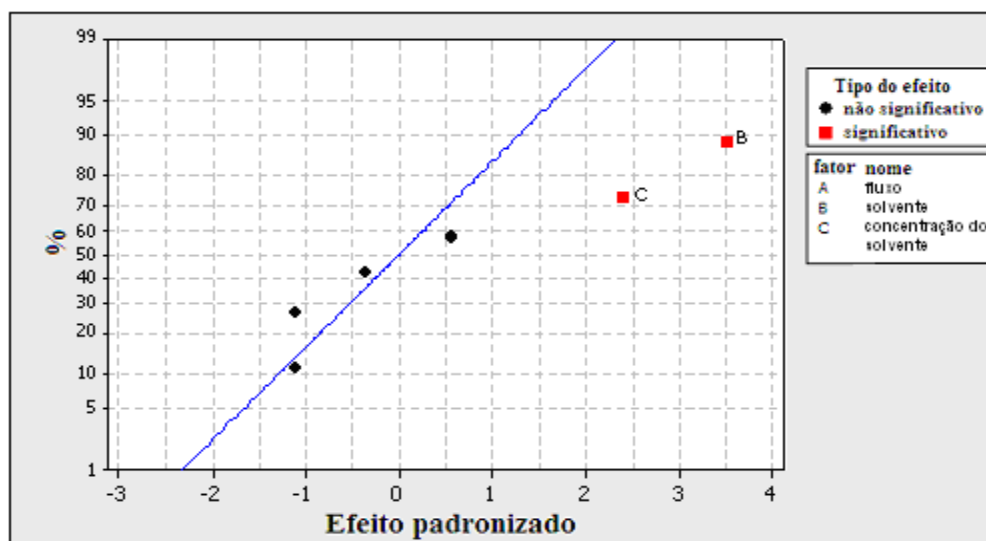


FIGURA 46 - GRÁFICO NORMAL DOS EFEITOS EM RELAÇÃO A R (%) NA OTIMIZAÇÃO DA SEPARAÇÃO DOS ENANTIÔMEROS DA DOPA ($\alpha = 0,05$)

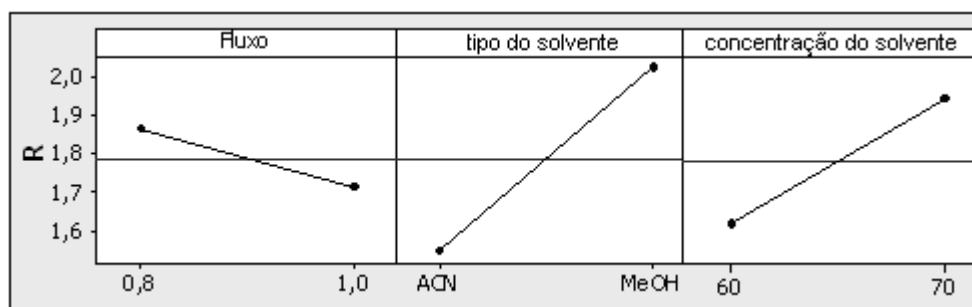


FIGURA 47 - EFEITOS SIGNIFICATIVOS E NÃO SIGNIFICATIVOS COM RELAÇÃO A R E O FLUXO (mL.min⁻¹), TIPO DO SOLVENTE (ACETONITRILA OU METANOL) E CONCENTRAÇÃO DO SOLVENTE (%) NA FASE MÓVEL NA SEPARAÇÃO DOS ENANTIÔMEROS DA DOPA

Não foi verificado efeito significativo de segunda ordem entre as variáveis, porém foi visualizada uma tendência de interação entre o fluxo e o tipo do solvente. Em fluxos menores, a resolução - obtida com metanol ou acetonitrila - tendeu a apresentar os mesmos resultados; já em fluxos maiores, a resolução aumentou com o metanol (fig. 48). Com solventes orgânicos, a interação dos enantiômeros com a fase móvel aumenta, portanto aumentando seu tempo de retenção; entretanto o solvente tem que ser polar o suficiente para permitir que as ligações de hidrogênio ocorram. Nesse sentido, o metanol, em maior quantidade, propiciou esse efeito.

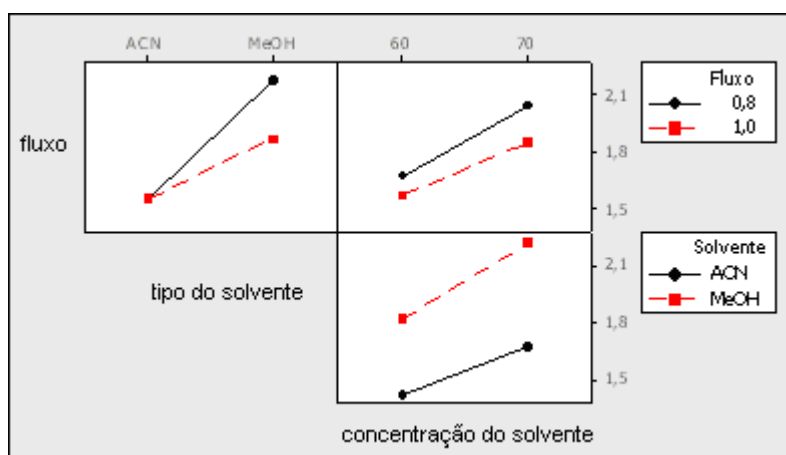


FIGURA 48 - GRÁFICOS DE INTERAÇÃO ENTRE AS VARIÁVEIS FLUXO (mL.min⁻¹), TIPO DO SOLVENTE (ACETONITRILA OU METANOL) E CONCENTRAÇÃO DO SOLVENTE (%) NA FASE MÓVEL, EM RELAÇÃO À R, NA SEPARAÇÃO DE ENANTIÔMEROS DA DOPA

Em otimizações univariadas, para a separação dos enantiômeros da dopa, foi visto o uso de acetonitrila, etanol e metanol. Em praticamente todos os casos, o metanol foi o solvente de escolha, com concentrações que variaram de 100 a 50% de metanol [55]-[57]. Em todos os casos, foi usado ácido para a protonação do grupo amino, geralmente o ácido sulfúrico ou perclórico [54]-[57]. Autores afirmam que a adição de ácido na fase móvel, nesses casos, facilita a formação do complexo diastereomérico entre a cavidade do éter de coroa e o enantiômero [55].

Nas separações quirais com fases móveis semelhantes, as fases estacionárias que contêm ligação covalente entre a sílica e o éter de coroa apresentam uma robustez maior do que as fases estacionárias que somente tem o éter de coroa depositado em sua superfície. Na separação de D,L-aminoácidos, quando o éter de coroa está depositado na cadeia alquílica de uma sílica de fase reversa, por exemplo, a passagem de uma solução contendo metanol leva a desorção do éter de coroa do suporte, pois o éter está aderido à sílica somente por interações hidrofóbicas [54][56]. No caso da coluna ChiroSil RCA (+), há uma ligação covalente entre o éter e a sílica, sendo possível, portanto, a utilização de soluções de solventes orgânicos sem desprendimento do éter de coroa.

Com relação aos aditivos modificadores de fase móvel, há o uso do ácido sulfúrico [55][57], do ácido perclórico e do acetato de amônio [54][56]. A presença do acetato de amônio diminuiu o tempo de retenção e aumentou a resolução de fenilglicina. Experimentos revelaram que em colunas de éter de coroa quimicamente ligado com a sílica, na fase móvel acetonitrila:água (água contendo ácido perclórico a 10 mM), o L-enantiômero foi eluído em 15 min enquanto que o D-enantiômero foi eluído em 102 min. Com a adição de acetato de amônio (1 mM) na fase móvel, há uma competição na formação do complexo quiral com o éter de coroa [56]. Como a resolução obtida na amostra 7 foi satisfatória, esse artifício não foi necessário. Em nenhum dos casos estudados, a ferramenta de otimização multivariada foi utilizada. Talvez, por método univariado, a otimização levasse a um resultado ótimo equivocadamente, não sendo possível o melhoramento da resolução sem a interferência de um aditivo como o acetato de amônio, por exemplo.

A escolha do detector eletroquímico se deu em função da sua sensibilidade. Em um estudo de separação quiral, foram comparados os limites de detecção obtidos pelo detector eletroquímico e o detector UV. Nesse relato, os

limites de detecção de D-dopa, na presença de L-dopa, foram menores com o detector eletroquímico do que com o detector UV [50].

Portanto, escolheu-se a fase móvel metanol:água (pH 3,03 com H_3PO_4) 70:30 (v/v), fluxo de $0,8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, para a separação de EP201. Percebeu-se somente a presença da L-dopa (fig. 49).

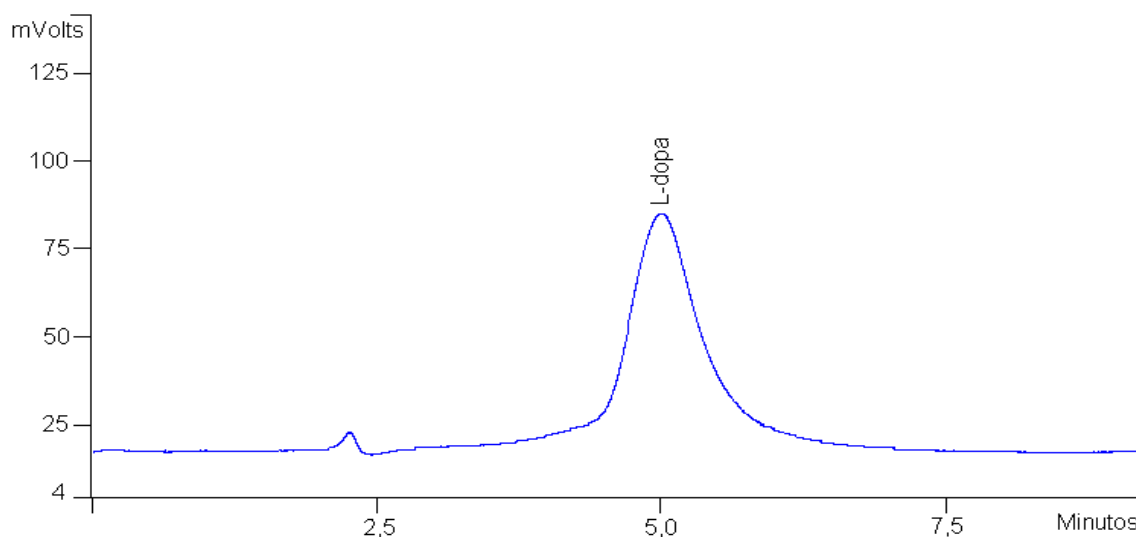
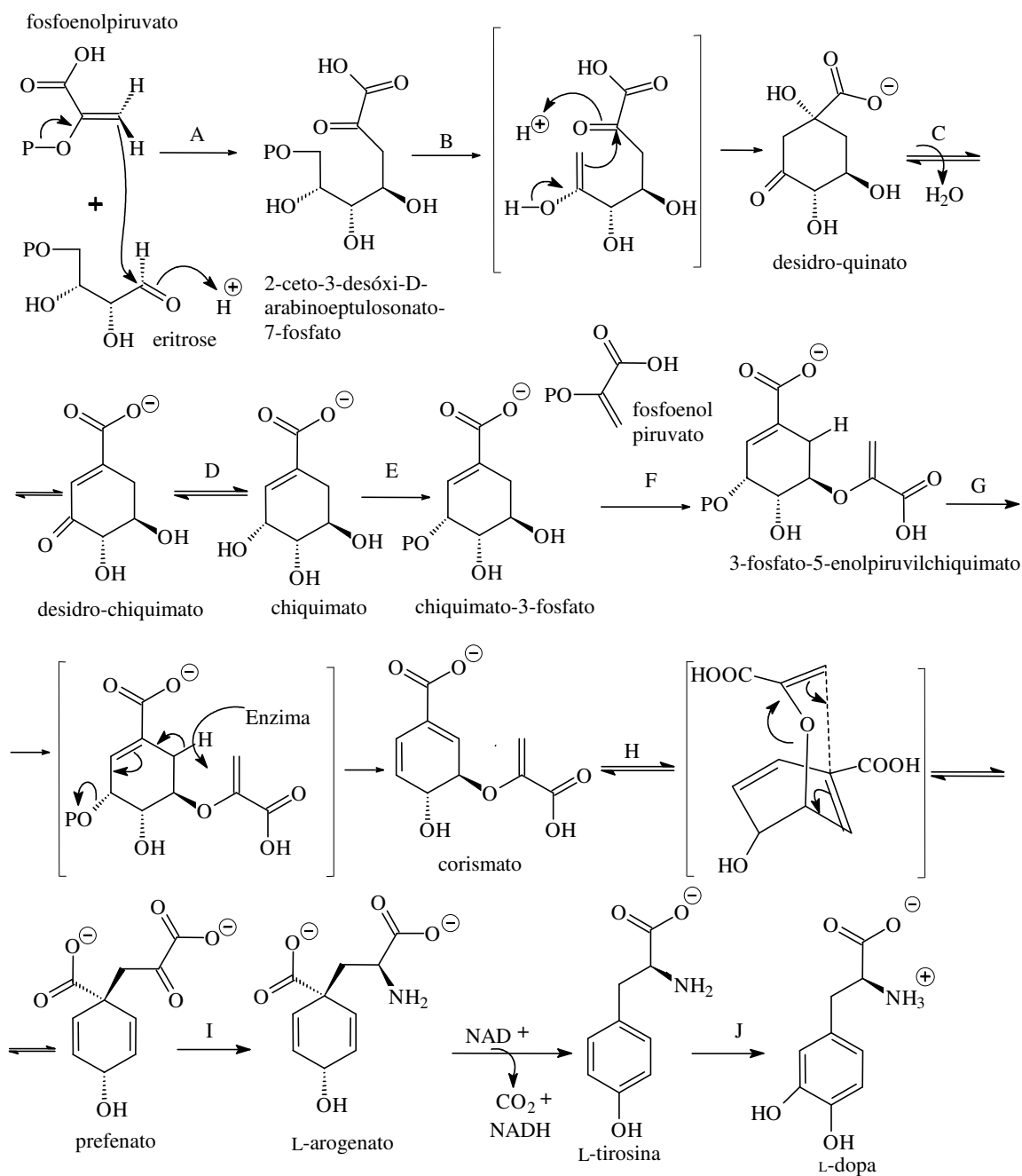


FIGURA 49 - CROMATOGRAMA DA SEPARAÇÃO QUIRAL DE EP201*

*Condições: coluna ChiroSil RCA (+), fase móvel metanol:água (70:30, v/v) a $0,8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, detector eletroquímico

A L-dopa, assim como a L-tirosina e a L-fenilalanina, são obtidas por meio da rota metabólica do ácido chiquímico. Esse ácido é criado a partir de duas moléculas: a eritrose 4-fosfato (da via das pentoses) e o fosfoenolpiruvato (da glicólise). A partir da formação do 3-desidro-chiquimato (precursor do ácido chiquímico) [114], há a geração do corismato, sendo esse considerado o ponto de ramificação para a síntese de três aminoácidos: triptofano, fenilalanina e tirosina. A fenilalanina pode ser precursora da L-dopa via tirosina [115] ou a L-dopa pode advir diretamente da tirosina [116]. Isso acontece porque o prefenato, molécula oriunda do corismato, pode gerar tanto a fenilalanina (pela enzima prefenato desidratase) quanto a tirosina (prefenato desidrogenase) [117][118]. Na tirosina, um novo grupo hidroxila pode ser incorporado no anel aromático por uma hidroxilase, na presença de tetraidrobiopterina e O_2 , gerando a L-dopa (fig. 50) [118]. A hidroxilação da tirosina é o início da síntese das catecolaminas e sujeita-se a inibição por meio dos produtos finais (*feedback* inibitório) [116]. Portanto, conclui-se que a mucuna não apresenta enzimas que trabalhem com substratos

do tipo D, somente com substratos do tipo L, (em relação ao gliceraldeído), visto que não foi encontrada a D-dopa na dopa isolada de sementes de mucuna.



ENZIMAS ENVOLVIDAS:

A- 2-ceto3-desóxi- D-arabinoeptulose-7-fosfato sintase
 B- desidroquinato sintase
 C- 3-desidroquinato desidratase
 D- chiquimato desidrogenase
 E- chiquimato quinase
 F- 3-fosfato-5-enolpiruvil chiquimato sintase

G- corismato sintase
 H- corismato mutase
 I- piridoxal fosfato
 J- hidroxilase com tetrahidrobiopterina e O_2

FIGURA 50 - ESQUEMA DE GERAÇÃO DA LEVODOPA A PARTIR DO FOSFOENOLPIRUVATO E ERITROSE 4-FOSFATO

Fonte: Adaptado de MANN (1986) [114]; NELSON, COX (2004) [117]; DEWICK (1997) [118]

4.6 Doseamento de fenólicos totais em mucuna por meio do reativo de Folin-Denis

4.6.1 Curva analítica com ácido 3-hidroxicinâmico (3HC) e linearidade

Os dados obtidos originaram uma curva analítica com a equação linear da reta igual a $Y = 0,32123X + 0,05485$, com $r = 0,99835$ (fig. 51), conforme o exigido ($r > 0,99$) [63]. O intervalo foi definido entre 0,1744 e 1,0464 mg 3HC.mL⁻¹.

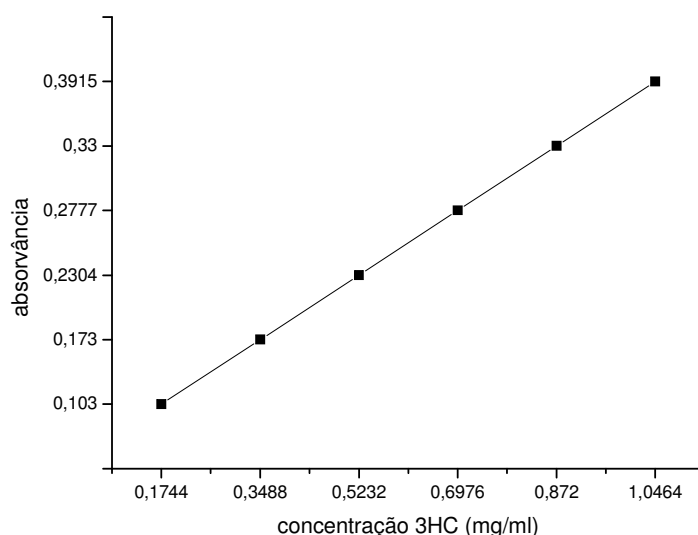


FIGURA 51 - CURVA ANALÍTICA DO 3HC

4.6.2 Obtenção do método de extração para o doseamento de fenólicos totais em mucuna

A escolha do preparo de amostra, para compostos fenólicos, deve levar em consideração qual é a classe de substâncias majoritárias presentes na parte do vegetal a ser estudada. No caso de fenólicos, são muitas as classes de substâncias presentes: vão desde ácidos orgânicos, flavonóides, alcalóides até fenilpropanóides e taninos. Essas classes de substâncias apresentam diferentes características de polaridade, extração e estabilidade. Isso explicaria porque um determinado método de preparo de amostra de uma espécie pode não ser adequado para outra planta, caso o objetivo seja dosear a quantidade máxima de

fenólicos totais existente na mesma. Na literatura existem diversas formas de se preparar amostras para determinação do teor de fenólicos totais: fervura com água em *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze [119]; misturas com metanol: acetona: água 70: 70: 30 para *Fagopyrum esculentum* Moench [120] ou metanol para própolis [121], água com agitação por ultrassom para *C. sinensis* [122], e para *M. pruriens* têm-se MeOH: H₂O 50:50 em banho a 95 °C por 10 min [98], solução de acetona a 70% em água [99], entre outros métodos. Na grande maioria dos casos, a otimização é por OVAT e o uso do planejamento fatorial para o preparo de amostras na área de produtos naturais ainda é muito pequeno. Pode-se citar o preparo de soluções extrativas aquosas das folhas de: *Bauhinia monandra* Kurz, Caesalpiniaceae [94] e *Phyllanthus niruri* L., Euphorbiaceae [95] [96] para quantificar flavonóides totais; e *Psidium guajava* L., Myrtaceae [97] para quantificar taninos totais, todos por UV.

Na tentativa de obter o melhor resultado para o doseamento de fenólicos totais em mucuna, fez-se o planejamento fatorial 2⁴ completo com ponto central, conforme a matriz de contrastes da tab. 14.

TABELA 14 – MATRIZ DE CONTRASTES DA OTIMIZAÇÃO PARA O DOSEAMENTO DE FENÓLICOS TOTAIS

Amostras	Tempo de extração	Líquido extrator	Tipo de extração	HCl 1,14 M
	5 min (-) ou 10 min (+)	H ₂ O (-) ou Etanol (+)	ultrassom (-) ou vórtex (+)	ausência (-) ou presença(+)
1	-1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1	-1
3	-1	1	-1	-1
4	1	1	-1	-1
5	-1	-1	1	-1
6	1	-1	1	-1
7	-1	1	1	-1
8	1	1	1	-1
9	-1	-1	-1	1
10	1	-1	-1	1
11	-1	1	-1	1
12	1	1	-1	1
13	-1	-1	1	1
14	1	-1	1	1
15	-1	1	1	1
16	1	1	1	1
pc1	0	0	0	0
pc2	0	0	0	0
pc3	0	0	0	0

Legenda: pc1, pc2 e pc3 são replicatas do ponto central, nas condições: 7,5 min de extração, sendo 3,75 min no ultrassom e 3,75 min no vórtex, com etanol:água 50:50 (v/v) a 0,57 M de HCl como líquido extrator

Observou-se que o melhor método de extração é o realizado com tempo de agitação de 5 min em vórtex, água deionizada com HCl 1,14 M como líquido extrator (amostra 9) (fig. 52 e 53). Um efeito de 1ª ordem foi visto com relação ao líquido extrator: o rendimento caiu ao usar etanol ao invés de água. Com a extração na presença de HCl, o rendimento aumentou, comprovando que HCl tem grande efeito sobre a extração dos fenólicos (efeito de 1ª ordem), provavelmente por aumentar a polaridade. Além disso, valores de pHs mais básicos solubilizam proteínas, que turvam a extração, interferindo no processo.

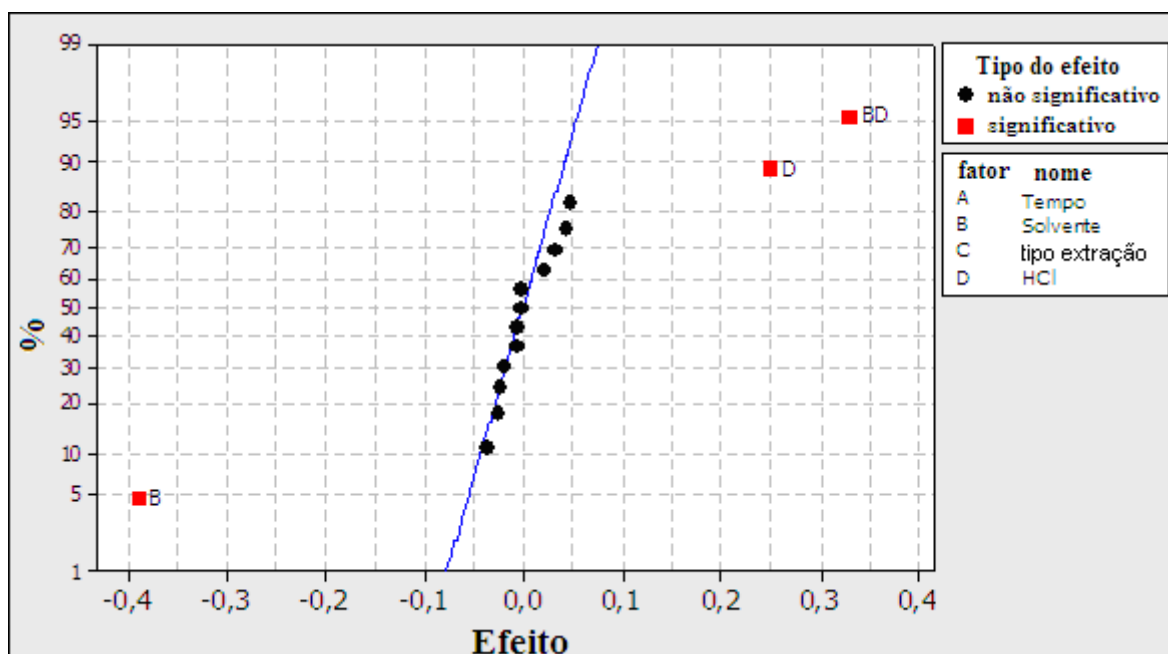


FIGURA 52 - GRÁFICO NORMAL DOS EFEITOS EM RELAÇÃO AO DOSEAMENTO DE FENÓLICOS ($\alpha=0,05$)

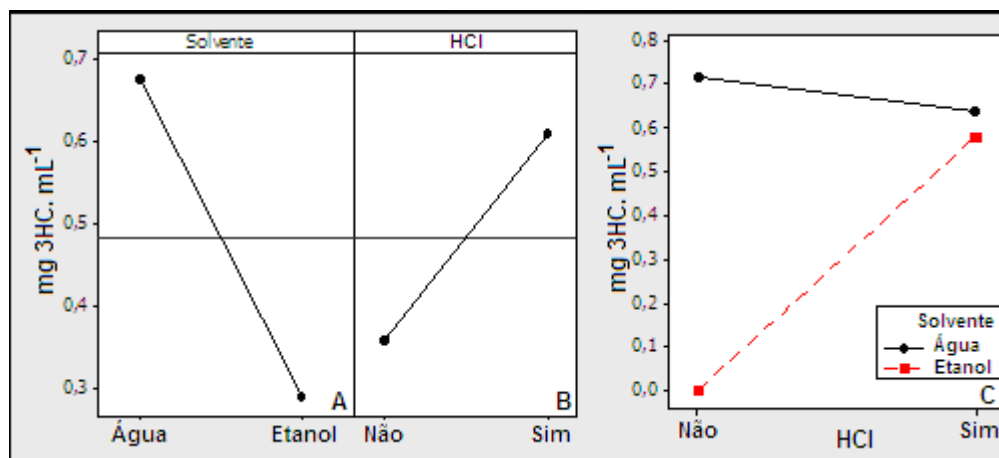


FIGURA 53 - GRÁFICOS DOS EFEITOS PRINCIPAIS “TIPO DE SOLVENTE (A), “PRESENÇA DE HCl” (B) E DE INTERAÇÃO ENTRE “TIPO DE SOLVENTE” E “PRESENÇA DE HCl” (C) EM RELAÇÃO AO DOSEAMENTO DE FENÓLICOS

Um efeito de 2ª ordem aconteceu entre o líquido extrator e a presença de HCl; a extração com etanol e HCl aumentou a extração dos fenólicos, provavelmente por deixar o meio mais polar. Provavelmente, esse efeito também ocorre com água. O tipo de extração e o tempo de extração não foram significativos, sendo escolhida a extração com o equipamento mais barato (vórtex) e o menor tempo.

4.6.3 Doseamento de fenólicos totais por reativo de Folin-Denis

A mensuração do teor de fenólicos totais foi considerada importante e relevante visto que as substâncias fenólicas podem estar contribuindo para o tratamento do MP. As substâncias fenólicas apresentam atividade antioxidante considerável e, como o metabolismo de pacientes de MP tem metabolismo oxidativo elevado, essas substâncias podem auxiliar no tratamento. Entre algumas substâncias fenólicas já isoladas de *Mucuna*, está a classe das tetraidroisoquinolinas e isoflavonas. Algumas tetraidroisoquinolinas já foram estudadas como possíveis fármacos para o tratamento de MP [39], e algumas isoflavonas apresentaram ação inibitória *in vitro* contra enzimas de degradação de levodopa, a DDC e a COMT, aumentando assim o interesse em mensurar os compostos fenólicos.

O melhor método de extração foi utilizado para o doseamento: consistiu na utilização de 5 min em vórtex, água deionizada e presença de ácido clorídrico 1,14 M como líquido extrator, sendo o processo repetido duas vezes. O teor de fenólicos totais é maior na variedade cinza, seguido da preta e da verde (tab. 15).

TABELA 15 - TEOR DE LEVODOPA POR CLAE E DE FENÓLICOS TOTAIS POR UV NAS VARIEDADES DE MUCUNA

<i>Variedade de Mucuna</i>	<i>Teor de levodopa por CLAE (%)</i>	<i>Teor de fenólicos totais por UV (3HC%)</i>
Cinza	4,61 ± 0,0219	2,97 ± 0,143
Preta	4,13 ± 0,139	2,92 ± 0,0930
Verde	3,82 ± 0,0311	2,59 ± 0,120

Tanto o doseamento de levodopa quanto o teor de fenólicos totais foram feitos com os mesmos lotes de *Mucuna* sp. Comparando-se a quantidade de

fenólicos totais com o valor obtido por CLAE para levodopa somente, percebe-se que o teor de fenólicos totais é menor que o teor de levodopa por CLAE. Quando se compara a quantidade em número de mol, ainda há diferença (ex.: $1,81 \cdot 10^{-5}$ mol 3HC/100 mg de semente var. cinza e $2,34 \cdot 10^{-5}$ mol de levodopa/100 mg de semente var. cinza). Uma explicação é que a mensuração de levodopa baseia-se em absorvância direta no UV, enquanto o outro teste é baseado em uma reação colorimétrica, que inclusive varia sua cor durante o tempo [80]. Perante a complexidade do reativo de Folin-Denis, não se sabe qual é a substância obtida no reagente, nem qual é o produto após a reação redox com o íon fenolato [123], para se calcular a estequiometria da reação, pois a levodopa tem duas hidroxilas fenólicas e o 3HC possui uma apenas. O reativo de Folin-Denis só fornece cor em contato com álcali [80]: a levodopa oxida-se com facilidade em meio básico, tornando impossível usar a levodopa como padrão. Perante essa característica, no doseamento, a levodopa pode ter se oxidado antes de reagir com reativo de Folin-Denis, diminuindo o teor de fenólicos totais. Além disso, as sensibilidades dos métodos são diferentes e, mesmo assim, os valores, inclusive em molaridade, foram bem próximos.

Estudos revelam que a quantidade de fenólicos totais de sementes de *Mucuna pruriens*, coletadas na Índia, foi de 6,23% de fenólicos totais (sem indicação do padrão de fenólicos) e 7,81% de levodopa [100]; entre 5,23 a 6,14% de fenólicos totais (sem indicação do padrão de fenólicos) e 3,625% a 4,7% de levodopa [101] usando Folin-Ciocalteu para doseamento, 7,75% de fenólicos totais expressos em *trans-sipanic acid* [sic] mensurado por reativo de Folin-Denis e 4,99% de levodopa [99]; 7,34% de fenólicos totais expressos em ácido tânico, em relação às sementes, medidos por meio de Folin-Ciocalteu [98]. Há também relatos de sementes de outras espécies, como a *M. gigantea* (Willd.) DC. que contém 2,07% de fenólicos totais (sem indicação do padrão de fenólicos) e 1,5% de levodopa [102]; *M. cochinchensis*, com 6,53% de fenólicos totais e 6,11% de levodopa, *M. rajada* com 6,23% de fenólicos totais e 5,35% de levodopa, *M. veracruz* com 5,24% de fenólicos totais e 6,35% de levodopa e *M. deeringeana* com 4,34% de fenólicos totais e 3,87% de levodopa - os fenólicos totais foram expressos em *trans-sipanic acid* [sic] mensurado por reativo de Folin-Denis [99]. Observa-se grande variação tanto no conteúdo de levodopa quanto no de fenólicos totais. Como os padrões de fenólicos não foram iguais e nem os

métodos de análise, a comparação torna-se difícil. Além disso, os coeficientes de absorvidade molar das substâncias utilizadas com o reativo de Folin-Denis podem ser diferentes entre si, impossibilitando comparações. Entretanto, percebe-se que a concentração de levodopa acompanha a de fenólicos totais, fato também observado nos experimentos realizados, e que nem sempre a concentração de levodopa é inferior a concentração de fenólicos totais. Além disso, as sementes definidas nos trabalhos não são as mesmas desse experimento: há variações de conteúdo químico, tanto na concentração de metabólitos especiais quanto na sua composição em diferentes substâncias químicas, sendo percebidas em mesmas espécies vegetais. Essas espécies são chamadas de quimiotipos – mesma espécie vegetal com conteúdo químico diferente. Isso pode ocorrer pela presença de caracteres genéticos flutuantes ou pelas variações do ambiente [124].

4.7 Validação da metodologia de quantificação da levodopa em plasma

4.7.1 Definição da fase móvel e adequação do sistema

Para a maioria das aplicações que envolvem amostras iônicas, a cromatografia de fase reversa é indicada e deve ser explorada primeiramente. Em casos em que as otimizações em fase reversa não resultem satisfatoriamente, a cromatografia de par iônico (IPC) pode ser considerada.

A IPC inclui um sistema de solvente que contém uma substância na forma ionizada de carga oposta a do analito, chamada de reagente de par iônico (IPR). Esse sistema é eluído através de uma fase estacionária normal ou reversa, e essa substância interage com a fase estacionária, recobrindo essa última. O IPR apresenta grupos alquílicos, sendo por isso atraído pela fase estacionária: pela hidrofobicidade presente em sua molécula. Há um equilíbrio entre o reagente de par iônico adsorvido na fase estacionária e esse mesmo reagente na fase móvel. A porção ionizada do IPR geralmente está balanceada por contra-íons, presentes no tampão da fase móvel ou no próprio reagente. Um analito, por exemplo, de carga positiva (uma base protonada), é trocado então pelo contra-íon. Como consequência, o analito fica ligado ao IPR pela presença da carga e particionado entre a fase móvel e a fase estacionária [125][126] (fig. 54).

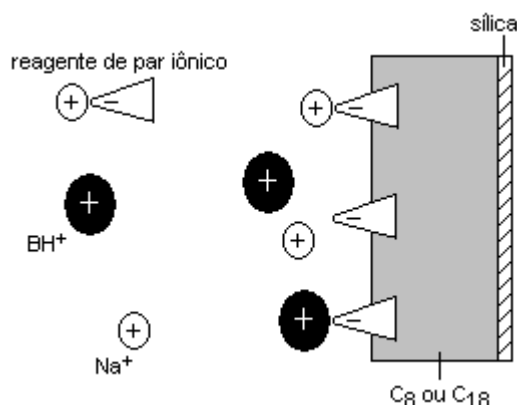


FIGURA 54 - ESQUEMA DE SEPARAÇÃO ENTRE O ANALITO (BH^+) E O REAGENTE DE PAR IÔNICO NA CROMATOLOGRAFIA DE PAR IÔNICO

Fonte: adaptado de SNYDER, KIRKLAND, GLAJCH (1997) [125]

As separações em IPC são mais complicadas para desenvolvimento e utilização, além de apresentarem problemas adicionais que, geralmente, não se aplicam às outras cromatografias de modo geral. Exemplos são a presença de picos de artefato (tanto positivos quanto negativos), equilíbrio lento da coluna cromatográfica em relação à recaptção e liberação do reagente de par iônico, impedimento na utilização do modo gradiente e falta de simetria dos picos causada pelos grupos silanóis residuais na fase reversa. Problemas de sensibilidade ao pH da fase móvel e sensibilidade à temperatura são muito freqüentes [125].

Alguns IPR utilizados para a separação de levodopa em plasma englobam o dodecilsulfato de sódio (0,7 mM com tampão e 12% de acetonitrila) [127], heptanosulfonato de sódio (0,5 mM com tampão e 2% de metanol [128]; 0,2 mM com tampão [31]; 0,5 mM com tampão e 2% de metanol [26]), octil sulfato de sódio (550 mg.mL^{-1} e 15% de metanol) [129], octanossulfonato de sódio (1,125 mM com tampão e 3% de metanol [130]; 1 mM com tampão e 16% de metanol [131]; 2,08 mM com tampão e 20% de metanol [132]). Já existem misturas comerciais de IPR com metanol e tampão fosfato, que foram usadas para separação de levodopa em sangue [78]. Existe a recomendação de que o IPR esteja em uma concentração bem maior que a do analito a ser separado [126]. Como há um equilíbrio de concentração entre o IPR depositado na sílica e o IPR em solução na fase móvel, todas as substâncias que interfiram nesse processo de equilíbrio podem comprometer a separação cromatográfica - é o caso de diferentes concentrações de solvente orgânico. A retenção do IPR na fase

estacionária é inversamente proporcional à quantidade de solvente orgânico na fase móvel. Além disso, diferentes alquilsulfonatos podem ser utilizados de acordo com a quantidade de solvente orgânico na fase móvel: quanto maior a cadeia alquílica do IPR, maior quantidade de solvente orgânico poderá ser usada na fase móvel. No caso de octanossulfonatos, a quantidade de metanol sugerida vai de 10 a 40%, utilizando de 10 a 100 mM do IPR na fase móvel [125]. Baseando-se nessa recomendação que se optou pelo uso de 12,715 mM de octanossulfonato de sódio para 10% de metanol.

Um fator crítico na IPC é o pH da fase móvel, pois a separação depende do grau de ionização do analito e do IPR [125][126]. Os pHs, reportados na literatura, variaram de 2,5 a 3,4 sendo todos em sistema tamponado com fosfato de sódio ou potássio [26][31][32][127][129][133]. Com relação ao tampão, há sugestões de que este esteja em concentração maior que o IPR na fase móvel [126]. O método escolhido apresentou um sistema tamponante, à base de fosfato, superior a 12,715 mM, com o contra-íon correspondente do IPR, no caso o sódio e pH 3,00. Nesse pH, praticamente todas as moléculas de levodopa estarão com o grupamento amina protonado (pK_a da amina: 8,7 [29]) Outro componente importante que sofre influência do sistema tamponante é o detector eletroquímico: sua sensibilidade aumenta na presença de um tampão. Optou-se também pelo uso do EDTA dissódico (0,054 mM), visto que seu uso é freqüente [127][130]-[133] como quelante de metais. A ambientação da fase estacionária é outro fator crítico de análise. A literatura recomenda 5 a 10 vezes o volume de uma coluna para a ambientação em cromatografia de fase reversa C_{18} e fase móvel água:acetonitrila. Com relação à IPC, o processo pode exigir entre 20-30 vezes o volume da coluna [125][126]. Como a coluna sempre foi ambientada por, no mínimo, quatro horas antes das análises, esse problema foi contornado.

Na análise de adequação do sistema, nenhum dos metabólitos eluiu no mesmo tempo de retenção da levodopa ou do padrão interno DHBA (fig. 55).

Com relação à adequação do sistema, foram analisados os dados relativos ao fator capacidade (K'), resolução (R), número de pratos teóricos (N) e caudamento do pico a 5% ($T_{5\%}$) da levodopa, dos metabólitos comuns da mesma (DOPAC, dopamina, 3OMD e HVA) e do padrão interno DHBA. Observou-se que os valores obtidos apresentaram-se dentro dos parâmetros exigidos ($K' > 2$ ou entre $2 < K' < 10$; $N > 2000$; $R > 2$; $T_{5\%} \leq 2$) [72]-[76] (tab. 16).

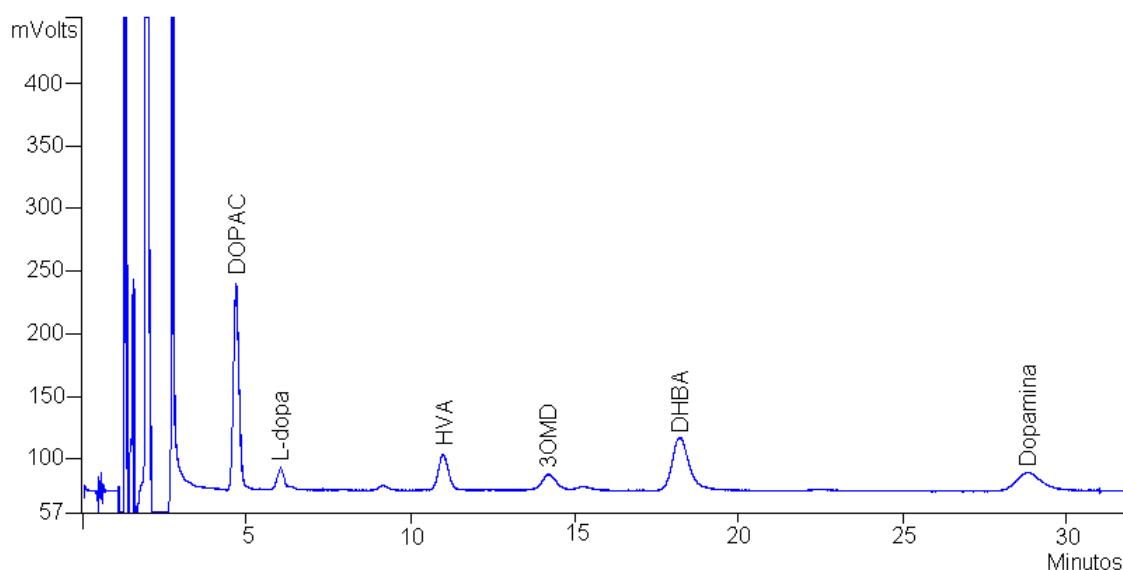


FIGURA 55 - CROMATOGRAMA DO PLASMA CONTAMINADO COM LEVODOPA, DOPAC, DOPAMINA, 3-O-METIL DOPA E DHBA*

*12,715 mM de octanossulfonato de sódio, 0,054 mM de EDTA dissódico, 10,9 mM de ácido cítrico, 25 mM de fosfato diácido de sódio em água ultra-pura, pH 3,00 mais 10% de metanol, fluxo de 1 mL.min⁻¹

TABELA 16 - RESULTADOS DA ADEQUAÇÃO DO SISTEMA EM RELAÇÃO A K', R, N E T_{5%} DE DOPAC, LEVODOPA, HVA, 3OMD, DHBA E DOPAMINA EM PLASMA

Substância	K'	R	N	T _{5%}
DOPAC	3,68	11	3741	1,04
Levodopa	5,04	4,0	3937	0,83
HVA	9,97	3,8	6316	1,14
3OMD	13,8	5,0	6018	1,0
DHBA	17,2	3,8	7005	1,36
Dopamina	27,82	9,4	7001	1,26

4.7.2 Definição do método de extração de levodopa em sangue para quantificação

Entre os anticoagulantes utilizados na coleta em experimentos para o doseamento de levodopa, alguns autores utilizaram EGTA – ácido etilenoglicol-bis-(β-aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetracético [78] ou ácido etilenodiaminotetracético - EDTA [133] e/ou um antioxidante, como o metabissulfito de sódio [32][36][134] ou a glutatona [78]. Na grande maioria dos trabalhos citados foi usada a heparina como anticoagulante [78][130][131][135][136], justificando-se assim sua escolha.

Optou-se por trabalhar com plasma, pois quando o método em questão for realizado com sangue de animais tratados com levodopa, a formação de coágulo pode desencadear perdas de levodopa.

Após a separação do plasma por centrifugação (7200 g, 15 min), a próxima fase consistiu na separação das proteínas solúveis do mesmo, pois estas podem contaminar a coluna cromatográfica. Alguns métodos fazem a desproteinização com ácido perclórico, com mais uma etapa de centrifugação [129], podendo ser adicionada uma mistura do plasma em banho de gelo com ácido clorídrico, etilenoglicol e trietilamina [31]. Outros autores utilizam a alumina para a retirada das proteínas [130][131][135][136]. O procedimento usando óxido de alumínio ou alumina apresenta desvantagens conforme alguns autores: geralmente é demorado e complicado (muitos passos, incluindo às vezes eluição em coluna cromatográfica), além da dificuldade na ativação da alumina e a baixa recuperação resultante desse procedimento de limpeza [26]. Entretanto, outros autores consideram que a desproteinização com ácido perclórico, ácido tricloroacético ou solventes orgânicos não retira bem as proteínas residuais de amostras biológicas, reduzindo assim o tempo de vida útil da pré-coluna e diminuindo a eficiência da coluna cromatográfica. Na desproteinização pode ser usada uma coluna com alumina, resina trocadora de cátions forte ou sílica C₁₈, apesar dessas duas últimas possibilidades fornecerem mais interferentes por não serem tão seletivas [131]. Baseando-se nisso, escolheu-se a precipitação com ácido perclórico com fase móvel, com a repetição do processo de congelamento/descongelamento/centrifugação para a diminuição das proteínas do meio.

4.7.3 Curva analítica da levodopa em plasma e linearidade

As concentrações de levodopa na amostra preparada, por cromatografia em par iônico e detector eletroquímico englobaram o intervalo entre 0,1 a 0,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Isso resulta em um intervalo na concentração de levodopa de 0,5 a 3,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em plasma, visto que a amostra foi preparada com 200 μL de plasma. As concentrações de levodopa no plasma, em experimentos com pacientes tratados com 100 a 300 mg/dose englobam de 1,89 - 4,59 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ [30], 0,013 - 0,168 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ [32], 0,50 - 1,90 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ [36], 1,7 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ [133], 1,41 - 2,09 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ [134] e 0,005 - 0,953 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ [136]. Percebe-se que, apesar do limite de detecção do

método desenvolvido ter sido de 0,5 µg de levodopa por mL de plasma, isso pode ser corrigido no preparo de amostra, com a adição de menor quantidade de fase móvel na diluição, por exemplo, resultando na detecção de valores menores de levodopa no plasma.

O r foi de 0,995438, conforme o exigido, que é o mínimo de 0,98 [63]. A equação da reta foi $Y = 7,56057 \cdot 10^4 X + 1,15628 \cdot 10^3$ (fig. 56) e o DPR% foi de 4,777%. Em termos de adequação do sistema, o fator de capacidade ($K' = 5,03$), resolução ($R > 2$), eficiência em pratos teóricos ($N = 6442$) e caudamento a 5% ($T_{5\%} = 1,07$) estiveram de acordo com o recomendado [72]-[76].

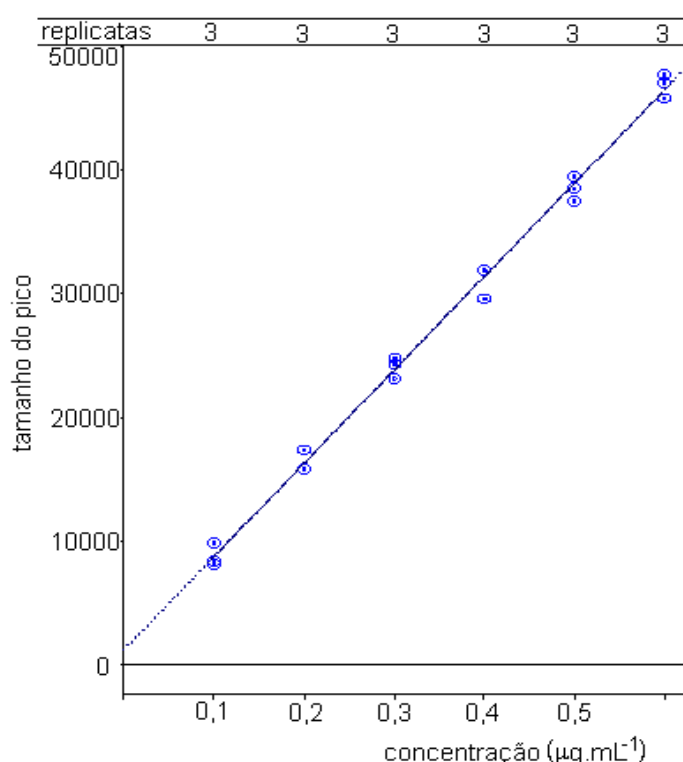


FIGURA 56 - CURVA ANALÍTICA DA LEVODOPA EM PLASMA, UTILIZANDO SEPARAÇÃO COM PAR IÔNICO* E DETECTOR ELETROQUÍMICO

*12,715 mM de octanossulfonato de sódio, 0,054 mM de EDTA dissódico, 10,9 mM de ácido cítrico, 25 mM de fosfato diácido de sódio em água ultra-pura, pH 3,00 mais 10% de metanol, fluxo de 1 mL.min⁻¹

4.7.4 Definição da exatidão do método

Para a verificação da exatidão, seguiu-se o exigido pela legislação brasileira [63]. A medida de erro relativo apresenta quão distantes os resultados estão do valor verdadeiro. Prepararam-se três níveis de concentração (0,10; 0,30 e 0,50 µg.mL⁻¹) em plasma (200 µL), com o mesmo preparo de amostra definido

em 3.7.2. Em cada nível, as amostras foram feitas em replicatas ($n=5$). A exatidão no menor nível de concentração ($0,10 \mu\text{g.mL}^{-1}$), que foi o limite inferior de quantificação (LIQ), apresentou 81,91% de recuperação ($\text{ER}\% = 18,09\%$). O nível intermediário de concentração ($0,30 \mu\text{g.mL}^{-1}$) apresentou 89,47% de recuperação ($\text{ER}\% = 10,53\%$) e o nível alto ($0,50 \mu\text{g.mL}^{-1}$) demonstrou 93,47% de recuperação ($\text{ER}\% = 3,53\%$) (fig. 57). Como a legislação brasileira permite, no LIQ, variação de no máximo 20%, e para os outros valores, até 15%, esses valores foram aceitos. Portanto, o método foi considerado exato.

Os $\text{ER}\%$ citados em literatura, em outros métodos de IPC, foram de 6,14-9,17% com heptanossulfonato de sódio [26], de -4,3 [sic] a 18% com ácido 1-heptanosulfônico [31], de -0,2 a 15,15% com CAT-A-PHASE (fase móvel comercial com reagente de par iônico não divulgado) [78], 4% com octanossulfonato de sódio [127] e 25,2 - 27,7% com octanossulfonato de sódio [130]. Os $\text{ER}\%$ publicados incluem recuperações de 72,3 - 104,3% e os dados obtidos encontram-se entre 81,91 - 93,47%, ou seja, as recuperações obtidas encontram-se dentro dos valores publicados em literatura. Alguns autores defendem que as catecolaminas geralmente apresentam recuperações baixas [130], provavelmente devido a facilidade em se oxidarem a quinonas.

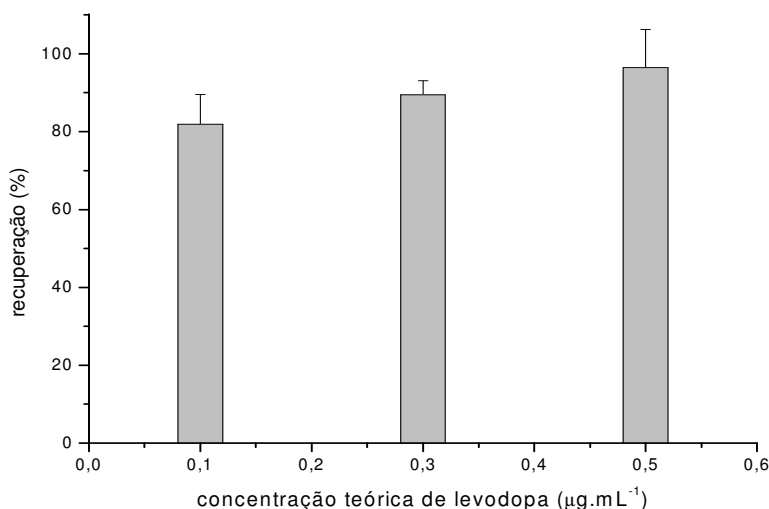


FIGURA 57 - RECUPERAÇÃO DA LEVODOPA NO PLASMA EM CONCENTRAÇÃO ALTA ($0,50 \mu\text{g.mL}^{-1}$), MÉDIA ($0,30 \mu\text{g.mL}^{-1}$) E BAIXA ($0,10 \mu\text{g.mL}^{-1}$)

4.7.5 Definição da precisão do método

Para a verificação da precisão, seguiu-se o exigido pela legislação brasileira [63]. Prepararam-se três níveis de concentração, (0,10; 0,30 e 0,50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) em plasma (200 μL), com o mesmo preparo de amostra definido em 3.7.2. Em cada nível, as amostras foram feitas em replicatas ($n=5$). Foi verificado que os resultados apresentaram resultados precisos, em termos de repetibilidade entre as replicatas, pois os valores de DPR% foram inferiores a 10% (tab. 17). A legislação brasileira preconiza que o desvio não pode superar 15%, exceto para o limite de quantificação, para o qual se admite desvios menores ou iguais a 20% [63].

TABELA 17 - RECUPERAÇÃO DE LEVODOPA EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES NO PLASMA

<i>Repetibilidade</i>	<i>Concentração teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)</i>	<i>Concentração média obtida ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)</i>	<i>DP</i>	<i>DPR%</i>
Três concentrações diferentes ($n=5$)	0,10	$0,082 \pm 0,072$	0,0063	7,7
	0,30	$0,27 \pm 0,011$	0,0096	3,6
	0,50	$0,48 \pm 0,054$	0,047	9,7

A precisão, medida em DPR%, em outros métodos de IPC, foram: 1,34 - 6,54% [31], 3,1 - 4,7% [26], 1,9 - 2,9% [130], 4,7% [127]. Como as concentrações utilizadas nas precisões mencionadas foram diversas e os valores obtidos (tab. 17) estão de acordo com o exigido pela legislação brasileira e não muito diferentes dos obtidos nos estudos citados, pode-se considerar que os DPR% foram aceitáveis.

4.7.6 Efeito matriz

Dá-se o nome de efeito matriz a toda variação causada por substâncias co-extrativas ao analito de interesse, que resulta em aumento ou diminuição da resposta, por afetar o desempenho das medições do equipamento [137]. A medição pode ser alterada porque os reagentes, matriz da amostra ou outros componentes alteram a sensibilidade do detector que mede o analito de interesse ou porque estes compostos afetam diretamente a resposta [138]. Para a verificação do efeito matriz, duas curvas analíticas, com mesmas concentrações,

foram preparadas: uma na matriz biológica (plasma) e outra no solvente da fase móvel. Para a análise do efeito matriz, analisou-se se os coeficientes angulares das duas curvas são estatisticamente diferentes, por meio do teste F [81].

Os coeficientes angulares observados apresentaram-se estatisticamente diferentes ($\alpha = 0,05$, $p < 0,01565$, F crítico = 3,369, F obtido = 4,898), ou seja, há diferença entre a curva obtida na matriz (plasma) e a curva obtida somente com o padrão diluído na fase estacionária (fig. 58).

Isso define que a melhor manufatura da curva analítica ocorre usando-se plasma contaminado com levodopa, para então realizar a extração pelo método de preparo de amostra definido. Ocorreu interferência da matriz na quantificação da levodopa, alterando-se a quantidade detectada. Esses efeitos são comuns em matrizes biológicas, e a construção da curva analítica na matriz extrativa evita problemas na exatidão.

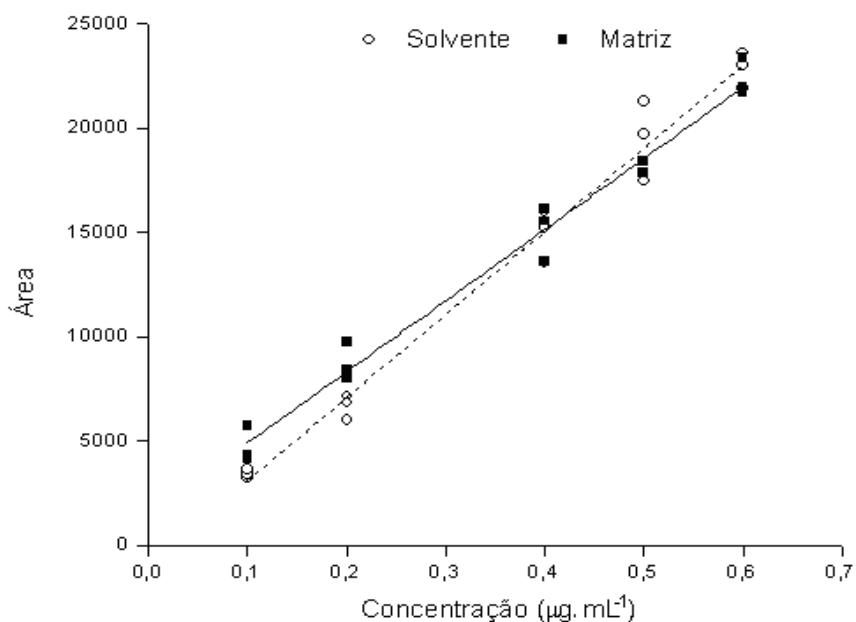


FIGURA 58 - CURVAS ANALÍTICA DA LEVODOPA PREPARADAS SOMENTE COM SOLVENTE (FASE MÓVEL) E NA MATRIZ (PLASMA BRANCO COM PREPARO DE AMOSTRA)

4.7.7 Definição da robustez do método

Para a mensuração de pequenas variações com relação ao método cromatográfico, um planejamento fatorial 2^2 foi construído - dois níveis e duas

variáveis, sendo: a quantidade adicionada de metanol na fase móvel (8% e 12%) e fluxo (0,8 e 1,2 mL.min⁻¹). Trabalhou-se com replicatas de cada ponto (n=3), sendo 10% quantidade de metanol adicionada na fase móvel e o fluxo de 1 mL.min⁻¹. A matriz de contrastes está na tab. 18.

TABELA 18 – MATRIZ DE CONTRASTES REFERENTE À ROBUSTEZ DO SISTEMA CROMATOGRÁFICO NA SEPARAÇÃO DA LEVODOPA EM PLASMA*

Amostras	Fluxo	Fase móvel
	0,8 mL.min ⁻¹ (-) ou 1,2 mL.min ⁻¹ (+)	77 %(-) de água ou 83 (+) % de água
1	-1	-1
2	1	-1
3	-1	1
4	1	1

*cada amostra foi obtidas em triplicata

Analizou-se, no planejamento referente ao método cromatográfico, o fator capacidade (K'), o caudamento a 5% do pico (T_{5%}) e a resolução dos picos (R), ao invés da quantidade de levodopa obtida, visto que variações no método cromatográfico alteram a área do pico e, conseqüentemente o teor obtido, impossibilitando que a avaliação fosse correta. Além disso, alterações no método não devem mudar o valor absoluto de analito; essa alteração somente pode ocorrer no preparo de amostra. Se alterações de quantidades forem vistas com mudanças de método cromatográfico, provavelmente são devidas a alterações de área do pico. Isso é confirmado pela utilização da mesma amostra para a avaliação das mudanças no método – como se trata da mesma quantidade, o teor não deve ter sido alterado.

Foi observado que, em relação a K', tanto o aumento na quantidade de metanol quanto o aumento no fluxo promoveram diminuição do tempo de retenção, diminuindo K' significativamente (fig. 59 e 60). Contudo, esses parâmetros não apresentam interação entre si, pois não foi percebido efeito de interação entre as variáveis. Na maioria dos casos, o tempo de retenção diminuiu quando se aumenta o fluxo. Quando, na fase móvel, a concentração de metanol aumentou de 8 para 12%, o tempo de retenção diminuiu. A diminuição da polaridade, pelo aumento da quantia de solvente orgânico na fase móvel, faz com que a retenção do IPR na fase estacionária seja menor [125], aumentando a quantidade de IPR na fase móvel. A levodopa, que no caso da cromatografia de par iônico interage com o IPR, pode apresentar mais afinidade pela fase móvel,

diminuindo assim K' , exatamente o contrário do obtido na cromatografia de fase reversa, onde a diminuição de polaridade da fase móvel propiciou o aumento de K' (fig. 15). O ideal é que o K' seja maior que 2 [72] ou entre 2 e 10 [73] e, nesse caso, os resultados foram satisfatórios.

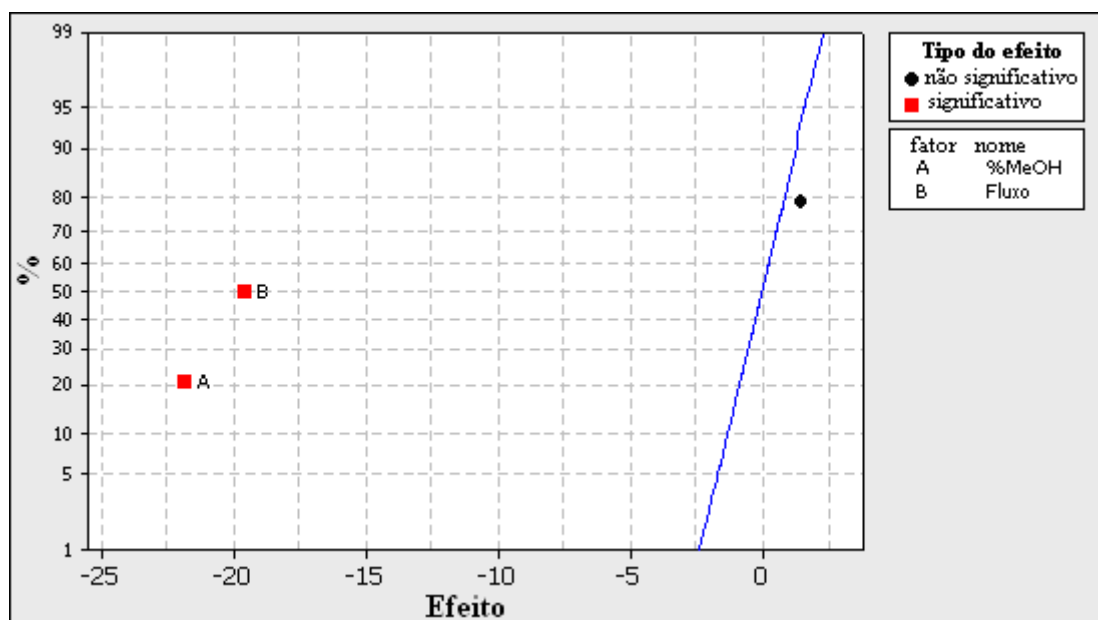


FIGURA 59 - GRÁFICO NORMAL DOS EFEITOS DO TEOR DE METANOL E FLUXO NA SEPARAÇÃO DE LEVODOPA NO PLASMA EM RELAÇÃO A K' ($\alpha = 0,05$)

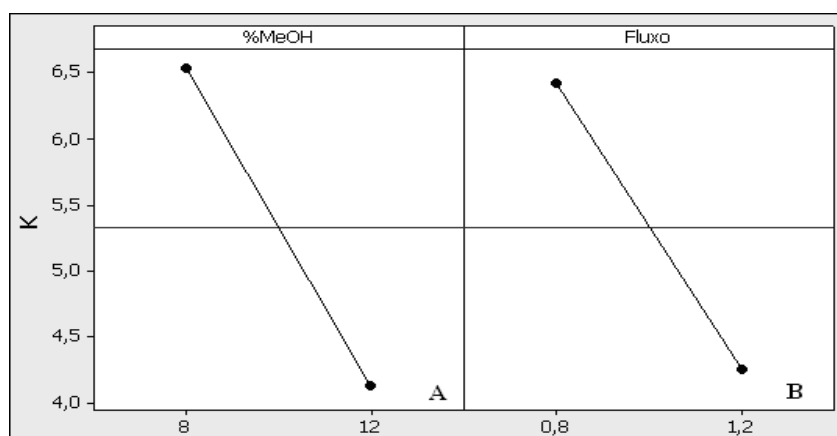


FIGURA 60 - GRÁFICOS DOS EFEITOS PRINCIPAIS “QUANTIDADE DE METANOL” (A) E “FLUXO” (B) EM RELAÇÃO A K'

Os valores obtidos de $T_{5\%}$ revelaram a ausência de influência dos fatores fluxo e quantidade de metanol, tanto como efeitos de 1ª ordem quanto de 2ª ordem (fig. 61). Somente tendências foram vistas na diminuição do $T_{5\%}$ com

aumento do teor de metanol e fluxo (fig. 62).

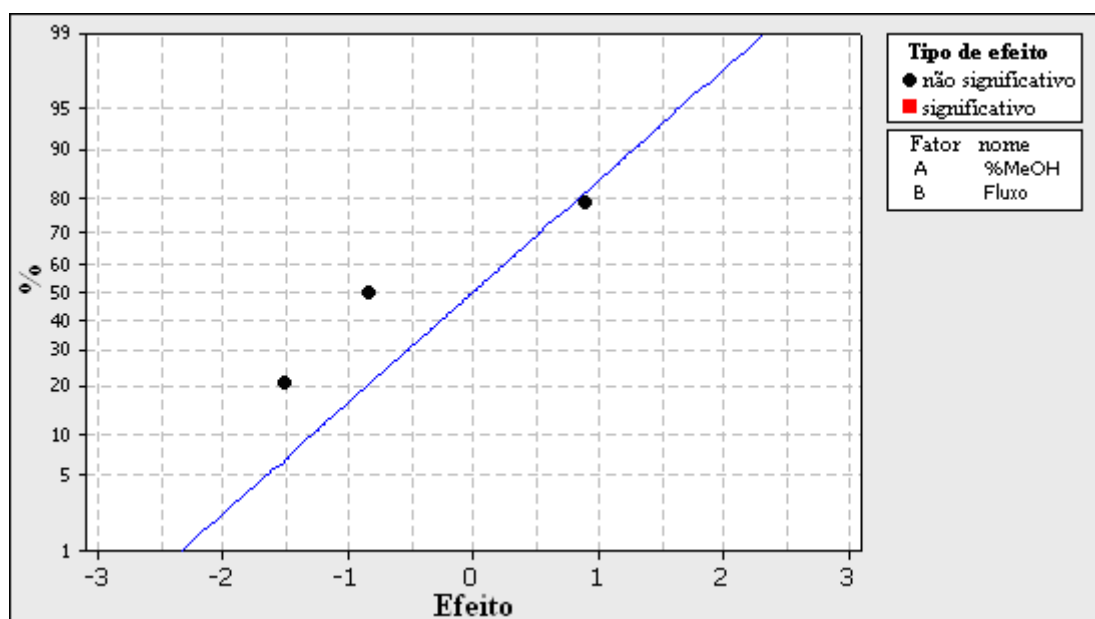


FIGURA 61 - GRÁFICO NORMAL DOS EFEITOS DO TEOR DE METANOL E FLUXO NA SEPARAÇÃO DE LEVODOPA NO PLASMA EM RELAÇÃO A $T_{5\%}$ ($\alpha = 0,05$)

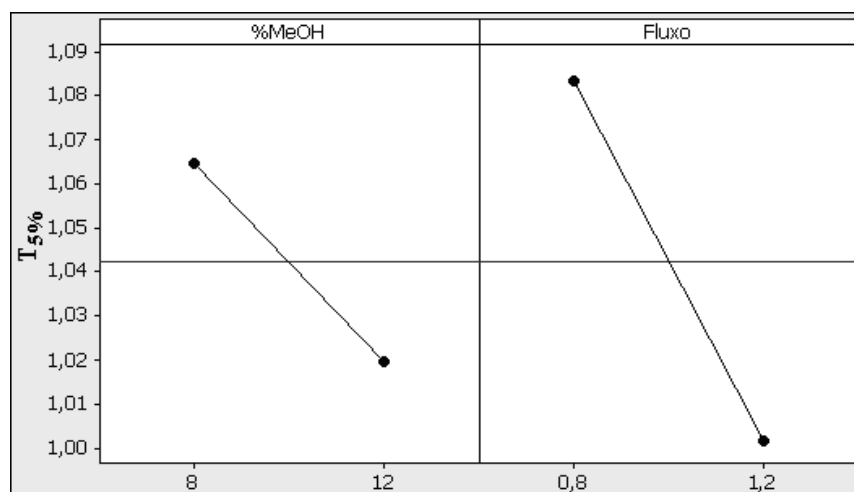


FIGURA 62 - GRÁFICOS DOS EFEITOS PRINCIPAIS “QUANTIDADE DE METANOL” (A) E “FLUXO” (B) EM RELAÇÃO A $T_{5\%}$

A resolução do pico da levodopa foi afetada por um efeito de 2ª ordem entre as duas variáveis: aumentando os níveis nas variáveis, ocorreu a diminuição de R. Não ocorreu efeito de 1ª ordem na avaliação do R (fig. 63 e 64). A resolução depende da largura do pico e da separação entre picos adjacentes, então

alterações de K' mais alterações de $T_{5\%}$ podem levar a resultados alterados de resolução. A relação entre K' e R é diretamente proporcional enquanto que a relação entre $T_{5\%}$ e R é inversamente proporcional. Percebeu-se que, mesmo as duas variáveis tendo efeito significativo de 1ª ordem no K' e tendências no $T_{5\%}$, isso pode ter influenciado no aparecimento do efeito de 2ª ordem, ocasionando a diminuição de R . Todavia, os valores obtidos permaneceram dentro do recomendando, que é de $R > 2$.

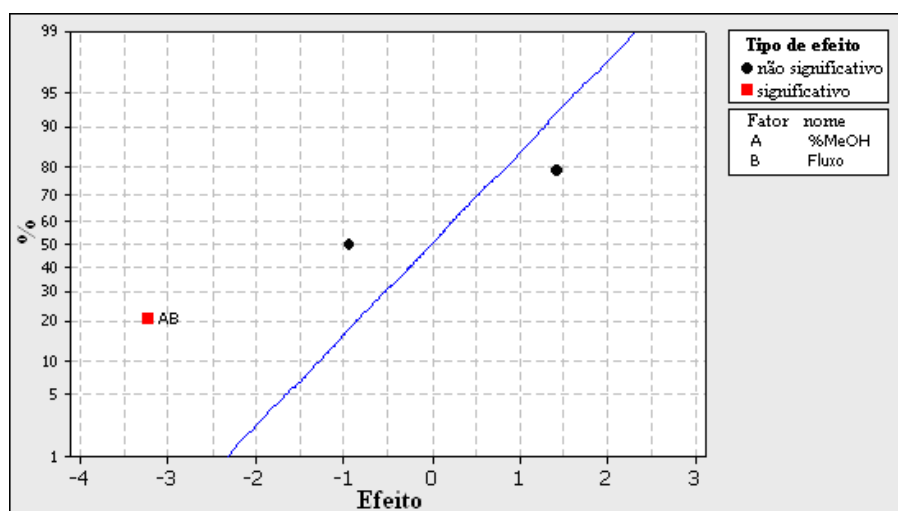


FIGURA 63 - GRÁFICO NORMAL DOS EFEITOS DO TEOR DE METANOL E FLUXO NA SEPARAÇÃO DE LEVODOPA EM PLASMA EM RELAÇÃO A R ($\alpha = 0,05$)

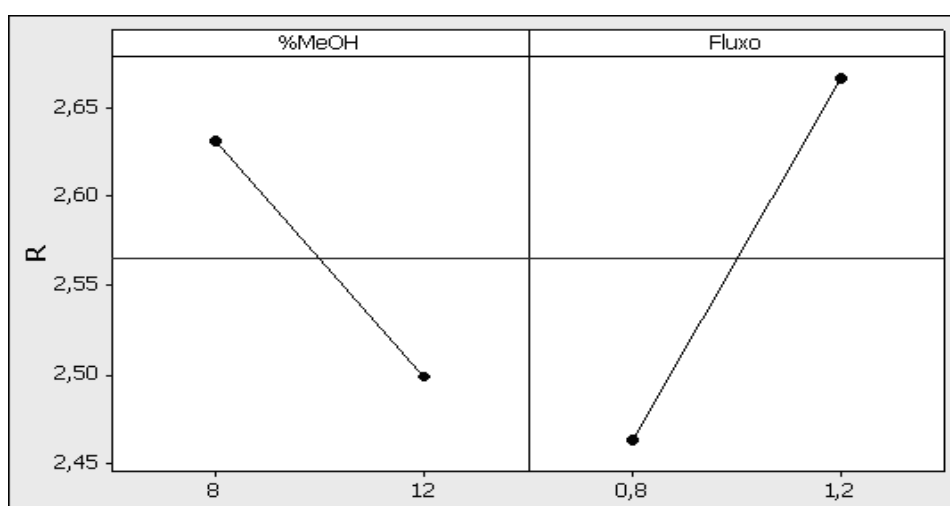


FIGURA 64 - GRÁFICOS DOS EFEITOS PRINCIPAIS “QUANTIDADE DE METANOL” (A) E “FLUXO” (B) EM RELAÇÃO A R

4.7.8 Doseamento de levodopa em plasma de animais tratados

Com a finalidade de verificar se o método validado se aplica, animais foram tratados com o padrão de levodopa acrescido de benzerazida por via intraperitoneal. Verificou-se que a separação foi eficiente, de acordo com o previsto (fig. 65).

Quando um inibidor de DDC (nesse caso a benzerazida) é utilizado para melhorar a biodisponibilidade de levodopa, a O-metilação da levodopa torna-se a via metabólica mais importante. A benzerazida, derivado hidrazínico inibidor da DDC, é utilizada em conjunto com a levodopa em uma proporção benzerazida/levodopa de 1:4. O início da ação inibidora da benzerazida é observado aos 30 min e sua duração é superior a 24 h. A benzerazida não atravessa a barreira hematoencefálica, inibindo, portanto, a descarboxilação da levodopa somente nos tecidos extra-cerebrais [35] (fig. 66).

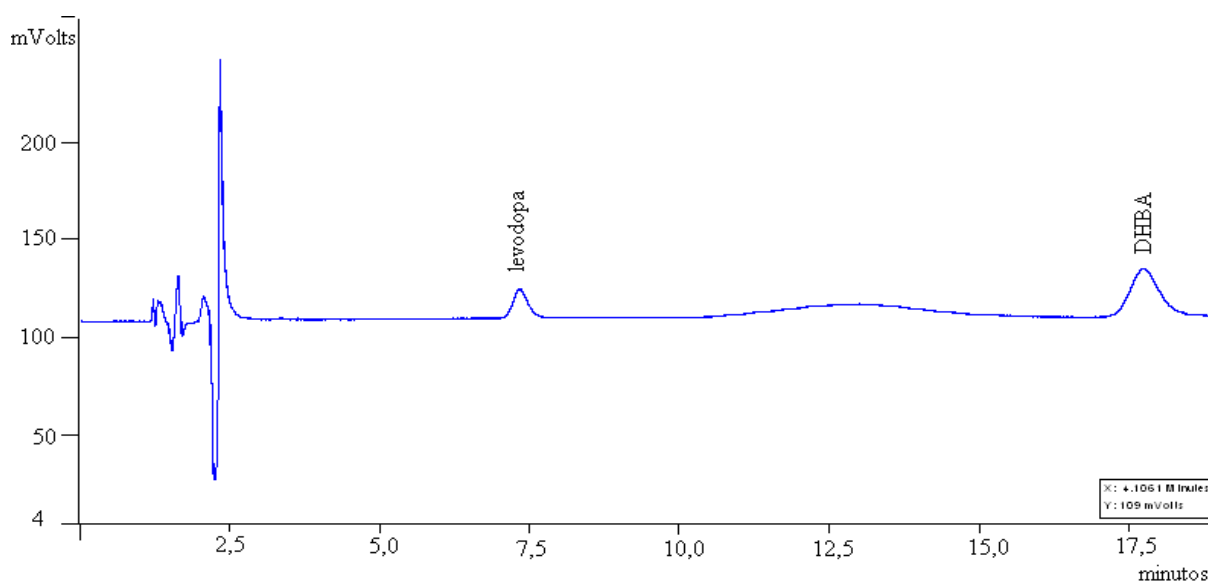


FIGURA 65 - CROMATOGRAMA DE PLASMA DE RATOS TRATADOS COM LEVODOPA E BENZERAZIDA (100 mg.kg^{-1} E 25 mg.kg^{-1}) *

*12,715 mM de octanossulfonato de sódio, 0,054 mM de EDTA dissódico, 10,9 mM de ácido cítrico, 25 mM de fosfato diácido de sódio em água ultra-pura, pH 3,00 mais 10% de metanol, fluxo de 1 mL.min^{-1}

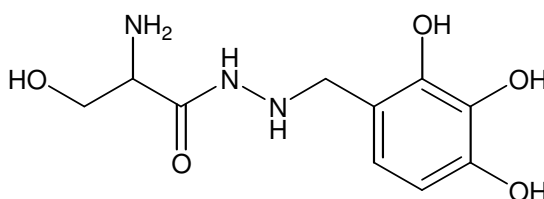


FIGURA 66 - ESTRUTURA DA BENZERAZIDA

Para a confirmação da separação obtida, foram verificados os parâmetros de adequação do sistema: fator capacidade (K'), resolução (R), número de pratos teóricos (N) e caudamento do pico a 5% ($T_{5\%}$). Os valores da adequação do sistema foram, em relação à levodopa: $K' = 6,36$, $N = 4515$, $R = 16$, $T_{5\%} = 1,2$ e para DHBA: $K' = 16,79$, $N = 7137$, $R = 16$, $T_{5\%} = 1,25$. Portanto, a separação foi extremamente satisfatória, podendo ser utilizada com eficiência na separação da levodopa mais DHBA em plasma, como por exemplo em ensaios pré-clínicos e clínicos. O valor obtido por tratamento intra-peritonal nos animais foi de $27,4 \pm 5,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de plasma. Os valores obtidos por diversas vias de administração variaram entre 3,92 a $15,7 \mu\text{g.mL}^{-1}$ [129][139]. O valor relativamente alto pode ser devido a via de administração intraperitonal, ao passo que os relatos citados trabalharam com via de absorção oral, influenciando no resultado doseamento pelo metabolismo intenso nessa via de absorção.

5 Considerações finais e conclusões

As sementes testadas, das três variedades de *M. pruriens*, apresentaram teor de levodopa de acordo com os valores encontrados nos relatos de literatura. A partir dessas sementes, foi obtido, por meio de otimização de experimentos com matriz fatorial, um extrato de mucuna (variedade preta) padronizado. O teor de levodopa nesse extrato foi de aproximadamente 12%, acima daqueles descritos na literatura, podendo servir como insumo na fabricação de um medicamento para o Mal de Parkinson. Além disso, uma metodologia para CLAE, para o doseamento de levodopa em mucuna (variedade preta) e no extrato seco foi validada, bem como foi desenvolvido um preparo de amostra, visando quantificar fenólicos totais no pó da semente por UV, todos com auxílio de planejamento fatorial. Conseguiu-se também o isolamento de levodopa de pó de mucuna, sendo esse confirmado por métodos físico-químicos. No desenvolvimento de uma metodologia de separação de enantiômeros da dopa, provou-se que há somente a presença de levodopa em sementes de mucuna preta e a otimização da fase móvel também utilizou planejamento fatorial. Realizou-se a validação analítica para um método de quantificação de levodopa em plasma, com avaliação da robustez por planejamento fatorial, visando próximas etapas do desenvolvimento do fitoterápico como, por exemplo, testes pré-clínicos e clínicos. Como perspectivas de novos trabalhos tem-se o desenvolvimento de estudos pré-clínicos e clínicos com o extrato obtido, além da separação de outras substâncias fenólicas na semente que podem contribuir para o tratamento do Mal de Parkinson.

Referências bibliográficas

- [1] MILLER, E. R. Dihydroxyphenylalanine, a constituent of the velvet bean. **Journal of Biological Chemistry**, v. 44, n. 2, p. 481-486, 1920.
- [2] DAMODARAN, M.; RAMASWAMY, R. Isolation of L-dopa from the seeds of *Mucuna pruriens*. **Biochemical Journal** v. 31, p. 2149-2151, 1937. Abstract. Disponível em **CAPLUS/ACS Sci finder**
- [3] GUGGENTHEIM, M. Dihydroxyphenylalanine, a new amino acid from *Vicia faba*. **Zeitschrift fur Physiologische Chemie**. v. 88, p. 276-84, 1914. Abstract. Disponível em **CAPLUS/ACS Sci finder**
- [4] DAXENBICHLER, M. E.; VanETTEN, C. H.; HALLINAN, E. A.; EARLE, F. R. Seeds as sources of L-dopa. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 5, p. 463-464, 1971.
- [5] WICHES, H. J.; VISSER, J. F.; HUIZING, H. J.; PRAS, N. Occurrence of L-DOPA and dopamine in plants and cell cultures of *Mucuna pruriens* and effects of 2,4-D and NaCl on these compounds. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 33, n. 3, p. 259-264, 1993.
- [6] PRAS, N.; WOERDENBAG, H. J.; BATTERMAN, S.; VISSER, J. F.; VAN UDEN, W. *Mucuna pruriens*: improvement of the biotechnological production of the anti-parkinson drug L-dopa by plant cell selection. **Pharmacy World & Science**, v. 15, n. 6, p. 263-268, 1993. Abstract. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=Text&DB=PubMed>> Acesso em 15 set 2002.
- [7] NASCIMENTO, J. C. **Isolamento e avaliação da atividade nematicida de constituintes químicos de *Mucuna cinerea* e quantificação de L-dopa em três espécies de mucuna**. Dissertação de mestrado. Viçosa, 1999, 118 p. Resumo. Disponível em <<http://ged.capes.gov.br/Agtest/silverstream/pages/pgRelatorioTesesCompleto.html>> Acesso em 15 set. 2002.
- [8] BELL, E. A.; NULU, J. R.; CONE, C. L-Dopa and L-3-carboxy-6,7-dihydroxy-1,2,3,4- tetrahydroisoquinoline, a new imino acid, from seeds of *Mucuna mutisiana*. **Phytochemistry**, v. 10, n. 9 , p. 2191- 2194, 1971.
- [9] DAXENBICHLER, M. E.; KLEIMAN, R.; WEISLEDER, D.; VanETTEN, C. H.; CARLSON, K. D. A new amino acid, (-)-1-methyl-3-carboxy-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline from Velvet beans. **Tetrahedron letters**, v. 13, n. 18, p. 1801-1802, 1972. **Chemical Abstract**.
- [10] GHOSAL, S; SINGH, S.; BHATTACHARYA, S. K. Alkaloids of *Mucuna pruriens* – chemistry and pharmacology. **Planta Medica**, v. 19, n. 3, p. 279-284, 1971.
- [11] SIDDHURAJU, P.; BECKER, K. Rapid reversed-phase high performance liquid chromatographic method for the quantification of L-Dopa (L-3,4-dihydroxyphenylalanine), non-methylated and methylate tetrahydroisoquinoline compounds from *Mucuna* beans. **Food Chemistry**, v. 72, n. 3, p. 389-394, 2001.
- [12] MISRA, L.; WAGNER, H. Alkaloidal constituents of *Mucuna pruriens* seeds. **Phytochemistry**, v. 65, n. 18, p. 2565-2567, 2004.
- [13] NAGASHAYANA, N.; SANKARANKUTTY, P.; NAMPOOTHIRI, M. R. V.; MOHAN, P. K.; MOHANAKUMAR, K. P. Association of L-DOPA with recovery following *Ayurveda* medication in Parkinson's disease. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 176, n. 2, p. 124-127, 2000.
- [14] MANYAM, B. V. Paralysis agitans and levodopa in "Ayurveda": ancient indian medical treatise. **Movement Disorders**, v. 5, n. 1, p. 47-48, 1990.
- [15] VAIDYA, A.. B.; RAJAGOPALAN, T. G.; MANKODI, N. A.; ANTARKAR, D.

- S.; TATHED, P. S.; PUROHIT, A. V.; WADIA, N. H.; Treatment of Parkinsons-Disease with the Cowhage Plant - *Mucuna-Pruriens* Bak. **Neurology India**, v. 26, n. 4, p.171-176, 1978.
- [16] HUSSAIN, G.; MANYAM, B. V. *Mucuna pruriens* proves more effective than L-DOPA in Parkinson's disease animal model. **Phytotherapy Research**, v. 11, n. 6, p. 419-423, 1997.
- [17] MANYAM, B. V. Drug development for parkinson's disease: *Mucuna pruriens*. **XIIth International Symposium on Parkinson's Disease**. Supl 1/1997, Londres, 23-26 mar. 1997. Abstract.
- [18] MAHAJANI, S. S.; DOSHI, V. J.; PARIKH, K. M.; MANYAM, B. V. Bioavailability of L-DOPA from HP-200 – a formulation of seed powder of *Mucuna pruriens* (Bak): a pharmacokinetic and pharmacodynamic study. **Phytotherapy Research**, v. 10, n. 3, p. 254-256, 1996.
- [19] KATZENSCHLAGER, R.; EVANS, A.; MANSON, P. N.; PATSALOS, P. N.; RATNARAJ, N.; WATT, H.; TIMMERMANN, L.; GIESSEN, R. V.; LEES, A. J. *Mucuna pruriens* in Parkinson's disease: a double blind clinical and pharmacological study. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v. 75, n. 12, p. 1672-1677, 2004.
- [20] HANDAJANI, S. Indigenous mucuna tempe as functional food. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 10, n. 3, p. 222-225, 2001. Abstract. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=Text&DB=PubMed>> Acesso em 15 set. 2002.
- [21] EZEAGU, I. E.; SRIDEVI, RAO AGA, HARANDRANATH, RAO AGA, GOWDA LR, TARAWALI, G. Prospects for incorporation of defatted *Mucuna* flour in biscuits formulation. **Journal of Food Science and Technology-Mysore**, v. 39, n. 4, p. 435-438, 2002.
- [22] GUERRANTI, R.; AGUIYI, J. C.; OGUELI, I. G.; ONORATI, G.; NERI, S.; ROSATI, F.; DEL BUONO, F.; LAMPARIELLO, R.; PAGANI, R.; MARINELLO, E. Protection of *Mucuna pruriens* seeds against *Echis carinatus* venom is exerted through a multiform glycoprotein whose oligosaccharide chains are functional in this role. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 323, n. 2, p. 484-490, 2004.
- [23] PATRIZI, L. D.; ROSATI, F.; GUERRANTI, R.; PAGANI, R.; GERWIG, G. J.; KAMERLING, J. P. Structural characterization of the N-glycans of gpMuc from *Mucuna pruriens* seeds. **Glycoconjugate Journal**, v. 23, n. 7-8, p. 599-609, 2006.
- [24] BHASKAR, A.; VIDHYA, V. G.; RAMYA, M. Hypoglycemic effect of *Mucuna pruriens* seed extract on normal and streptozotocin - diabetic rats. **Fitoterapia**, v. 79, n. 7-8, p. 539-543, 2008.
- [25] STANDAERT, D. G.; YOUNG A. B. Treatment of Central Nervous System Degenerative Disorders. **Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics**. 9. ed. HARDMAN, J. G.; GILMAN, G. A.; LIMBIRD, L. E.(eds), McGraw-Hill: New York, 1996, p. 503-520. CD-Rom
- [26] SAGAR, K. A.; SMYTH, M. R. Simultaneous determination of levodopa, carbidopa and their metabolites in human plasma and urine samples using LC-EC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 22, n. 3, p. 613-624, 2000.
- [27] RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997, 692 p.
- [28] CASPI, O.; THOMSON, C. Parkinson's disease: "don't become your disease!" **Integrative Medicine**, v. 2, n. 1 p. 37-42, 1999.

- [29] DELGADO, J. N.; PRABHU, V. A. Amino acids, proteins, enzymes, and hormone peptides. In: DELGADO, J. N.; REMERS, W. A. (ed) **Wilson and Gisvold's Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry**. 10 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p. 835, 1998.
- [30] SIMON, N.; GANTCHEVA, R.; BRUGUEROLLE, B.; VIALLET, F. The effects of a normal protein diet on Levodopa plasma kinetics in advanced Parkinson's disease. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 10, n. 3, p. 137–142, 2004.
- [31] MOSES, J.; SIDDIQUI, A.; SILVERMAN, P. B. Sodium benzoate differentially blocks circling induced by D- and L-dopa in the hemi-parkinsonian rat. **Neuroscience Letters**, v. 218, n. 3, p. 145-148, 1996.
- [32] SAXER, C.; NIINA, M.; NAKASHIMA, A.; NAGAE, Y.; MASUDA, N. Simultaneous determination of levodopa and 3-O-methyldopa in human plasma by liquid chromatography with electrochemical detection. **Journal of Chromatography B**, v. 802, n. 2, p. 299-305, 2004.
- [33] MÜLLER, T.; WOITALLA, D.; FOWLER, B.; KUHN, W. 3-OMD and homocysteine plasma levels in parkinsonian patients. **Journal of Neural Transmission**, v. 109, n. 2, p. 175–179, 2002.
- [34] KAO, H. D.; TRABOULSI, A.; ITOH, S.; DITTER, L.; HUSSAIN, A. Enhancement of the systemic and CNS specific delivery of L-dopa by the nasal administration of its water soluble prodrugs. **Pharmaceutical Research**, v. 17, n. 8, p. 978-984, 2000.
- [35] PR Vade mécum. **Dicionário de Especialidades Farmacêuticas**. Soriak, 1998. CD ROM.
- [36] BETTINI, R.; ACERBI, D.; CAPONETTI, G.; MUSA, R.; MAGI, N.; COLOMBO, P.; COCCONI, D. Influence of layer position on in vitro and in vivo release of levodopa methyl ester and carbidopa from three-layer matrix tablets. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 53, n. 2, p. 227–232, 2002.
- [37] KANKKUNEN, T.; HUUPPONEN, I.; LAHTINEN, K.; SUNDELL, M.; EKMAN, K.; KONTTURI, K.; HIRVONEN, J. Improved stability and release control of levodopa and metaraminol using ion-exchange fibers and transdermal iontophoresis. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 16, n. 4-5, p. 273–280, 2002.
- [38] LEPPÄNEN, J.; HUUSKONEN, J.; NEVALAINEN, T.; GYNTER, J.; TAIPALE, H.; JÄRVINEN, T. Design and Synthesis of a Novel L-Dopa-Entacapone Codrug. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 6, p. 1379-1382, 2002.
- [39] ABE, K.; SAITOH, T.; HORIGUCHI, Y.; UTSONOMIYA, I.; TAGUCHI, K. Synthesis and neurotoxicity of tetrahydroisoquinoline derivatives for studying Parkinson's disease. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. 8, p. 1355-1362, 2005.
- [40] TRIPATHI, B.; UPADHYAY, A. K. Antioxidant property of *Mucuna pruriens* Linn. **Current Science**, v. 80, n. 11, p. 1377-1378, 2001.
- [41] UMEZAWA, H.; TOBE, H.; SHIBAMOTO, N.; NAKAMURA, K.; MATSUZAKI, M.; TAKEUCHI, T. Isolation of isoflavones inhibiting DOPA decarboxylase from fungi and *Streptomyces*. **Journal of Antibiotics**, v. 28, n. 12, p. 927-952, 1975. Abstract. Disponível em **CAPLUS/ACS Sci finder**
- [42] BLANCO, M.; VALVERDE, I. Chiral and non chiral determination of Dopa by capillary electrophoresis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 31, n. 3, p. 431-438, 2003.
- [43] LIMA, L. M.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. O renascimento de um

- fármaco: talidomida. **Química Nova**, v. 24, n. 5, p. 683-688, 2001.
- [44] LIMA, V. L. E. Os fármacos e a quiralidade: uma breve abordagem. **Química Nova**, v. 20, n. 6, p. 657-663, 1997.
- [45] WU, M.; ZHOU, X. J.; KONNO, R.; WANG, Y. X. D-dopa is unidirectionally converted to L-dopa by D-amino acid oxidase, followed by dopa transaminase. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 33, n. 11, p. 1042-1046, 2006.
- [46] PETRITIS, K.; VALLEIX, A.; ELFAKIR, C.; DREUX, M. Simultaneous analysis of underivatized chiral amino acids by liquid chromatography-ionspray tandem mass spectrometry using a teicoplanin chiral stationary phase. **Journal of Chromatography A**, v. 913, n. 1-2, p. 331-340, 2001.
- [47] GHASSEMPOUR, A.; ABDOLLAHPOUR, A.; TABAR-HEYDAR, K.; NABID, M. R.; MANSOURI, S. ABOUL-ENEIN, H. Y. Crystalline degradation products of vancomycin as a new chiral stationary phase for liquid chromatography. **Chromatographia**, v. 61, n. 3-4, p. 151-155, 2005.
- [48] DOLEŽALOVÁ, M.; TKACZYKOVÁ, M. Direct high-performance liquid chromatographic determination of the enantiomeric purity of levodopa and methyl dopa: comparison with pharmacopoeial polarimetric methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 19, n. 3-4, p. 555-567, 1999.
- [49] GILON, C.; LESHEM, R.; TAPUHI, Y.; GRUSHKA, E. Reversed phase chromatographic resolution of amino acid enantiomers with metal-aspartam eluants. **Journal of American Chemical Society**, v. 101, n. 25, p. 7612-7613, 1979.
- [50] ARAI, T. Chiral separation of pharmaceuticals possessing a carboxy moiety. **Journal of Chromatography B**, v. 717, n. 1-2, p. 295-311, 1998.
- [51] YE, Y. K.; LORD, B. S.; YIN, L.; STRINGHAM, R. W. Enantioseparation of amino acids on a polysaccharide-based chiral stationary phase. **Journal of Chromatography A**, v. 945, n.1-2, p. 147-159, 2002.
- [52] HOFSTETTER, O.; LINDSTROM, H.; HOFSTETTER, H. Effect of the mobile phase on antibody-based enantiomer separations of amino acids in high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1049, n.1-2, p. 85-95, 2004.
- [53] NISHI, H.; NAKAMURA, K.; NAKAI, H.; SATO, T. Separation of enantiomers and isomers of amino compounds by capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography utilizing crown ethers. **Journal of Chromatography A**, v. 757, n. 1-2, p. 225-235, 1997.
- [54] MACHIDA, Y.; NISHI, H.; NAKAMURA, K.; NAKAI, H.; SATO, T. Enantiomer separation of amino compounds by a novel chiral stationary phase derived from crown ether. **Journal of Chromatography A**, v. 805, n.1-2, p. 85-92, 1998.
- [55] HYUN, M. H.; JIN, J. S.; LEE, W. Liquid chromatographic resolution of racemic amino acids and their derivatives on a new chiral stationary phase based on crown ether. **Journal of Chromatography A**, v. 822, n. 1, p. 155-161, 1998.
- [56] HYUN, M. H.; HAN, S. C.; LIPSHUTZ, B. H.; SHIN, Y. J.; WELCH, C. J. New chiral crown ether stationary phase for the liquid chromatographic resolution of α -amino acid enantiomers. **Journal of Chromatography A**, v. 910, n. 2, p. 359-365, 2001.
- [57] LEE, W.; JIN, J. Y.; BAEK, C. S. Comparison of enantiomer separation on two chiral stationary phases derived from (+)-18-crown-6-2,3,11,12-tetracarboxylic acid of the same chiral selector. **Microchemical Journal**, v. 80, n. 2, p. 213-217, 2005.

- [58] USP 25 NF 20. Levodopa. In: **The United States Pharmacopoeia - the National Formulary**. Rockville: United States Pharmacopeial Convention Inc, 2002, 2675 p.
- [59] FARMACOPÉIA Brasileira. Levodopa. In: **Farmacopéia Brasileira** 3. ed. São Paulo: Andrei, 1977, p. 545-547, 1024-1026.
- [60] BRASIL, Resolução RDC n° 48, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **D.O.U. – Diário oficial da união**; poder executivo, de 18 de março de 2004.
- [61] ICH - INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. **Text on validation of analytical procedures - Q2A**. 1994. 7 p. Disponível em <<http://www.ich.org/MediaServer.jserv?@ID=417&@MODE=GLB>> Acesso em 18 fev. 2005.
- [62] ICH - INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. **Validation of analytical procedures: methodology - Q2B**. 1996. 5 p. Disponível em <<http://www.ich.org/MediaServer.jserv?@ID=418&@MODE=GLB>> Acesso em 18 fev. 2005.
- [63] BRASIL, Resolução RE n° 899, 29 de maio de 2003. Guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **D.O.U. – Diário Oficial da União**; poder executivo, de 02 de junho de 2003.
- [64] USP 28 NF 23. Active Principles and Marker Compounds. In: **The united states pharmacopeia – the national formulary**, Rockville: The United States Pharmacopeial Convention Inc., 2005. 1 CD-ROM.
- [65] LEITE, J. T. C. **Obtenção de extrato de inulina de chicória (*Cichorium intybus*) por abaixamento de temperatura e secagem por spray dryer**. Dissertação, 155 p., 2001. Disponível em <<http://www.fea.unicamp.br/alimentarium/index.php>> Acesso em 02 jul. 2007.
- [66] DEAK, N. A.; JOHNSON, L. A. Effects of Extraction Temperature and Preservation Method on Functionality of Soy Protein. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 84, n. 3, p.259–268, 2007.
- [67] MALVERN INSTRUMENTS. **Spray drying and atomization overview**. 2007. Disponível em <<http://www.malvern.com/ProcessEng/processes/spraydrying/overview.htm>> Acesso em 02 jul. 2007.
- [68] CORRÊA, J. L. G. **Discussão de parâmetros de projeto de secadores ciclônicos**. Tese, 169 pág. 2003. Disponível em <http://www.les.ufpb.br/portal/index.php?option=com_docman&task=cat_view&gid=19&Itemid=30> Acesso em 07 jul. 2007.
- [69] SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J. Application of statistics to data treatment and evaluation. In:--, **Fundamentals of Analytical Chemistry**. 7. ed. Ford Worth: Saunders, 1996, p. 47-70.
- [70] VIEIRA, S. **Estatística Experimental**. 2. ed. São Paulo: Atlas, 1999, 186 p.
- [71] TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. **Planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais**. 2006. Disponível em <<http://lqta.iqm.unicamp.br/>> Acesso em 05 mar. 2007.
- [72] FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Reviewer guidance: validation of chromatographic methods**. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). 1994, 33 p. Disponível em <<http://www.fda.gov/cder/guidance/cmc3.pdf>> Acesso em 11 ago. 2006.
- [73] HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. SKOOG, D. A. Introdução às Separações Cromatográficas. In:--. **Princípios de Análise Instrumental**. 5 ed. Porto Alegre:

- Bookman, p. 598-617, 2002.
- [74] RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.
- [75] ICH - INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. **Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)**, 2005. 17 p. Disponível em <<http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf>> Acesso em 11 ago. 2006.
- [76] USP 28 NF 23 – General information <1225>, Validation of Compendial Methods. In: **The United States Pharmacopeia – the National Formulary**, Supplement 2,. Rockville (MD, USA): The United States Pharmacopeial Convention Inc., 2005. 1 CD-ROM.
- [77] MYHRMAN, R. Analysing for L-dopa. Part II. Alternate methods of extraction and quantitation by CLAE using absorbance detectors. **Mucuna News**, july, p. 4-8, 2001.
- [78] KARIMI M.; CARL, J. L.; LOFTIN, S.; PERLMUTTER, J. S. Modified high-performance liquid chromatography with electrochemical detection method for plasma measurement of levodopa, 3-O-methyldopa, dopamine, carbidopa and 3,4-dihydroxyphenyl acetic acid. **Journal of Chromatography B**, v. 836, n. 1-2, p. 120–123, 2006.
- [79] FARMACOPÉIA brasileira, Determinação da granulometria dos pós. In: **Farmacopéia Brasileira**, 4. ed., Parte I. São Paulo: Atheneu, 1988.
- [80] FOLIN, O.; DENIS, W. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 12, n. 2, p. 239-243, 1912.
- [81] INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. **65.3120.078: métodos de análise para resíduos de medicamentos veterinários em alimentos: protocolo de validação**. Brasil, 2003.
- [82] HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. SKOOG, D. A. Introdução às Separações Cromatográficas. In:--. **Princípios de análise instrumental**. 5 ed. Porto Alegre: Bookman, p. 598-617, 2002.
- [83] RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004
- [84] THE merck index. Levodopa. **The merck index**, , version 12.3, 20. ed. New Jersey: Champman & Hall/CRC, 2000, 1 CD-ROM.
- [85] PERALTA-ZAMORA, P.; MORAIS, J. L.; NAGATA, N. Por que otimização multivariada? **Engenharia sanitária e ambiental**, v. 10, n. 2, p. 106-110, 2005.
- [86] GOODING, O. W. Process optimization using combinatorial design principles: parallel synthesis and design of experiment methods. **Current opinion in chemical biology**, v. 8, n. 3, p. 297–304, 2004.
- [87] BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos – pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 2. ed. Campinas: editora da Unicamp, 2003, 401 p.
- [88] TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química nova**, v. 29, n. 2, p. 338-350, 2006.
- [89] EIRAS, S. P.; COSCIONE, A. R.; ANDRADE, J. C.; CUSTODIO, R. **Métodos de otimização em química - método do planejamento fatorial**. Última atualização abril 2000. Disponível em <<http://www.chemkeys.com/bra/md/>>

- peeo_6/mdoeq_1/mdpf_3/mdpf_3. htm> Acesso em 28 abr 2007.
- [90] BRERETON, R. G. Chemometrics in Analytical Chemistry - A Review. **Analyst**, v. 112, n. 12, p. 1635-1657, 1987.
- [91] FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guidelines on general principles of process validation**, 1987, 14 p. Disponível em <<http://www.fda.gov/cdrh/ode/425.pdf>> Acesso em 11 ago. 2006.
- [92] COLLINS, C.H. Princípios básicos de cromatografia. In: **Introdução a métodos cromatográficos** (COLLINS, C.H.; BRAGA, G. B.; BONATTO, P. S. org.). 7. ed. Campinas: Editora da Unicamp, 1997, p. 21.
- [93] SOARES, L. A. L.; SOUZA, T. P.; GONZÁLEZ ORTEGA, G.; PETROVICK, P. R. Use of central composite design to evaluate the robustness of a LC-method. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 6, p. 904-908, 2007.
- [94] FERNANDES, A. J. D.; CUNHA, F. P.; SOUZA, T. P.; SOARES, L. A. L. Padronização de solução extrativa aquosa de *Bauhinia monandra* Kurz (Caesalpiniaceae) empregando planejamento fatorial. **Biofarma**, v. 2, n. 4, p. 282-290, 2007.
- [95] SOARES, L. A. L.; GONZÁLEZ ORTEGA, G.; BASSANI, V. L.; PETROVICK, P. R. Desenvolvimento tecnológico de soluções extrativas aquosas de *Phyllanthus niruri* L. (quebra-pedra) empregando planejamento fatorial. **Caderno de Farmácia**, v. 14, n. 1-2, p. 21-26, 1998.
- [96] SOARES, L. A. L.; BASSANI, V. L.; GONZÁLEZ ORTEGA, G.; PETROVICK, P. R. Total flavonoid determination fot the quality control of aqueous extractives from *Phyllanthus niruri* L. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 22, n. 3, p. 203-207, 2003.
- [97] SILVA, I. V.; FERREIRA, M. S.; WARDERLEY, A. G.; FERNANDES, M. J.; SOARES, L. A. L.; SOUZA, T. P. Influence of extractive parameters on the preparation of a solution from *Psidium guajava* L. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, n. 1, p. 116-120, 2009.
- [98] BHAT, R.; SRIDHAR, K. R.; TOMITA-YOKOTANI, K. Effect of ionizing radiation on antinutritional features of velvet bean seeds (*Mucuna pruriens*). **Food Chemistry**, v. 103. n. 3, p. 860-866, 2007.
- [99] ADEBOWALE, Y. A.; ADEYEMI, A.; OSHODI, A. A. Variability in the physicochemical, nutritional and antinutritional attributes of six *Mucuna* species. **Food Chemistry**, v. 89, n. 1, p. 37-48, 2005.
- [100] SIDDHURAJU, P.; VIJAYAKUMARI, K.; JANARDHANAN, K. Chemical composition and protein quality of the little-known legume, velvet bean (*Mucuna pruriens* (L.) DC. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 9, p. 2636-2641, 1996.
- [101] SIDDHURAJU, P.; BECKER, K.; MAKAR, H. P. S. Studies on the nutritional composition and antinutritional factors of three different germplasm seed materials of an under-utilized tropical legume, *Mucuna pruriens* var. utilis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48 n. 12, p. 6048-6060, 2000.
- [102] RAJARAM, N.; JANARDHANAN, K. The biochemical composition and nutritional potential of the tribal pulse, *Mucuna gigantea* (Willd.) DC. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 41, n. 1, p. 45-51, 1991.
- [103] VADIVEL, V.; JANARDHANAN, K. Nutritional and antinutritional characteristics of seven south indian wild legumes. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 60, n. 2, p. 69-75, 2005.
- [104] PUGALENTI, M.; VADIVEL, V.; SIDDHURAJU, P. Alternative food/feed perspectives of an underutilized legume *Mucuna pruriens* var. utilis - a review. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 60, n. 4, p. 201-218, 2005.

- [105] MOHAN, V. R.; JANARDHANAN, K. Chemical analysis and lesser known pulses nutritional assessment of the genus, *Mucuna*. **Food Chemistry**, v. 52, n. 3, p. 275-280, 1995.
- [106] MARTÍNEZ, B. RINCÓN, F. IBÁÑEZ, M. V. Optimization of Tannin Extraction from Infant Foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 6, p. 2097-2100, 2000.
- [107] PRETSCH, E.; SEIBL, J.; SIMON, W.; CLERC, K. **Tables of Spectral Data for Structure Determination of Organic Compounds**. 2 ed. Berlin: Springer-Verlag, 1989.
- [108] SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 1998.
- [109] SAYYED, I. A.; SUDALAI, A. Asymmetric synthesis of L-DOPA and (*R*)-selegiline via, OsO₄-catalyzed asymmetric dihydroxylation. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 15, n. 19, p. 3111-3116, 2004.
- [110] TALEBPOUR, Z.; HAGHGOO, S.; SHAMSIPUR, M. ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy analysis for simultaneous determination of levodopa, carbidopa and methylidopa in human serum and pharmaceutical formulations. **Analytica Chimica Acta**, v. 506, n. 1, p. 97-104, 2004.
- [111] GÜNTHER, H. **NMR spectroscopy**. 2. ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2001.
- [112] REGIS TECHNOLOGIES, INC. **ChiroSil RCA(+) and SCA(-)**. Disponível em <<http://www.registech.com/Markets/Chiral/ChiroSil/Products/ChiroSil.html>> Acesso em 02 abr 2009.
- [113] BANG, E.; JUNG, J. W.; LEE, W.; LEE, D. W.; LEE, W. Chiral recognition of (18-crown-6)-tetracarboxylic acid as a chiral selector determined by NMR spectroscopy. **Journal of Chemical Society – Perkin transactions 2**, n. 9, p.1685-1692, 2001.
- [114] MANN, J. **Secondary Metabolism**. Oxford: Oxford University Press, 1986.
- [115] SHETTY, P.; ATALLAH, M. T.; SHETTY, K. Stimulation of total phenolics, L-DOPA and antioxidant activity through proline-linked pentose phosphate pathway in response to proline and its analogue in germinating fava beans (*Vicia faba*). **Process Biochemistry**, v. 38, n.12, p. 1707-1717, 2003.
- [116] RANDHIR, R.; VATTEM, D.; SHETTY, K. Solid-state bioconversion of fava bean by *Rhizopus oligosporus* for enrichment of phenolic antioxidants and L-DOPA. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 5, n. 2, p. 235-244, 2004.
- [117] NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 4. ed. New York: Worth Publishers, 2004, p. 848-851.
- [118] DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products – a biosynthetic approach**. Chichester: John Wiley & Sons, 1997, 466 p.
- [119] PRADO, C. C.; ALENCAR, R. G.; PAULA, J. R.; BARA, M. T. F. Avaliação do teor de polifenóis da *Camellia sinensis* (chá verde). **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 2S, n. 2, p. 164-167, 2005.
- [120] ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, v. 64, n. 4, p. 555-559, 1999.
- [121] FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Análise de própolis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 171-178, 2006.
- [122] LAGO, D. F.; PAULA, J. R.; BARA, M. T. F. Estudo comparativo sobre a eficiência de métodos de extração dos polifenóis do chá verde (*Camellia sinensis*). **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 4S, n. 2, p. 28-31, 2007.

- [123] SCHOFIELD, P.; MBUGUA, D. M.; PELL, A. N. Analysis of condensed tannins – a review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 91, n. 1-2, p. 21-40, 2001.
- [124] EVANS, W. C. **Trease and Evans' Pharmacognosy**. 14. ed. London: W. B. Saunders, 1996, p. 59-68.
- [125] SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. Ionic samples: reversed-phase, ion-par and ion-exchange. In: -- **Practical HPLC method development**. 2.ed. New York: John Wiley & Sons, 1997, p.292-349.
- [126] SADEK, P. C. **Troubleshooting HPLC systems – a bench manual**. New York: John Wiley & Sons, 2000, p. 85-88.
- [127] BLANDINI, F.; MARTIGNONI, E.; PACCHETTI, C.; DESIDERI, S.; RIVELLINI, D.; NAPPI, G. Simultaneous determination of L-dopa and 3-O-methyldopa in human platelets and plasma using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. **Journal of Chromatography B**, v. 700, n. 1-2, p. 278-282, 1997.
- [128] RIHBANY, L. A.; DELANEY, M. Determination of impurities in levodopa and carbidopa by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. **Journal of Chromatography A**, v. 248 n. 1, p. 125-133, 1982.
- [129] ZHANG, J.; QU, F.; NAKATSUKA, A.; NOMURA, T.; NAGAI, M.; NOMOTO, M. Pharmacokinetics of L-dopa in plasma and extracellular fluid of striatum in common marmosets. **Brain Research** v. 993, n. 1-2, p. 54-58, 2003.
- [130] LETELLIER, S.; GARNIER, J. P.; SPY, J.; BOUSQUET, B. Determination of the L-DOPA/ L-tyrosine ratio in human plasma by high-performance liquid chromatography. Usefulness as a marker in metastatic malignant melanoma. **Journal of Chromatography B**, v. 696, n. 1, p. 9-17, 1997.
- [131] TOLOKÁN, A.; KLEBOVICH I.; BALOGH-NEMES, K.; HORVAI, G. Automated determination of levodopa and carbidopa in plasma by high-performance liquid chromatography-electrochemical detection using an on-line flow injection analysis sample pretreatment unit. **Journal of Chromatography B**, v. 698, n. 1-2, p. 201-207, 1997.
- [132] DETHY, S.; LAUTE, M. A.; VAN BLERCOM, N.; DAMHAUT, P.; GOLDMAN, S.; HILDEBRAND, J. Microdialysis-HPLC for plasma levodopa and metabolites monitoring in parkinsonian patients. **Clinical Chemistry**, v. 43, n. 5, p. 740-744, 1997.
- [133] BLANDINI, F.; FANCELLU, R.; MARTIGNONI, E.; MANGIAGALLI, A.; PACCHETTI, C.; SAMUELE, A.; NAPPI, G. Plasma homocysteine and L-dopa metabolism in patients with Parkinson disease. **Clinical Chemistry**, v. 47, n. 6, p. 1102-1104, 2001.
- [134] CREVOISIER, C.; ZERR, P.; CALVI-GRIES, F.; NILSEN, T. Effects of food on the pharmacokinetics of levodopa in a dual-release formulation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 55, n. 1, p. 71-76, 2003.
- [135] WU, R. M.; TAI, C. H.; CHEN, R. C. Monitoring of the levodopa concentration-response relationship in Parkinson's disease. **The Kaohsiung Journal of Medical Sciences**, v. 16, n. 3, p. 117-125, 2000. **Biological Abstract**.
- [136] MOHR, C.; LANDIS, T.; BRACHA, H. S.; FATHI, M.; BRUGGER, P. Human locomotion: levodopa keeps you straight. **Neuroscience Letters**, v. 339, n. 2, p. 115–118, 2003.
- [137] JESUS, D. A. **Determinação de resíduos de avermectinas no leite por CLAE–EM/EM**. Dissertação de mestrado. Curitiba, 2007, 131 p.
- [138] COMISSÃO TÉCNICA DE LABORATÓRIOS DE ENSAIO – QUÍMICA

(CTLE-05) **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos - DOQ-CGCRE-008**. Revisão 1. Divisão de Credenciamento de Laboratórios (Dicla) da CGCRE/INMETRO, 2003, 35 p.

- [139] NISSINEN, E.; NISSINEN, H.; LARJONMAA, H.; VÄÄNÄNEN, A.; HELKAMAA, T.; REENILÄ, I.; AND RAUHALA, P. The COMT inhibitor, entacapone, reduces levodopa-induced elevations in plasma homocysteine in healthy adult rats. **Journal of Neural Transmission**, v. 112, n. 9 p. 1213-1221, 2005.

Seção B

1 *Boswellia serrata* Roxb.

1.1 *Propriedades químicas e farmacológicas de B. serrata* Roxb.

As resinas de espécies de *Boswellia* são utilizadas para o tratamento de doenças inflamatórias na medicina tradicional indiana - medicina Ayurvédica [1] [2]. Essas resinas são misturas complexas, apresentando em seus extratos orgânicos brutos misturas de mono, di e triterpenos [1]. Também chamada de *Salai guggal* ou *indian olibanum*, a resina pode ser utilizada na medicina tradicional para o tratamento de artrite, espondilose e bronquite, entre outras afecções inflamatórias. A planta, da qual se retira a resina, é encontrada nas regiões montanhosas da Índia central e na região costeira Coromandal, na Índia [3]. Em 1982, seu extrato bruto foi introduzido comercialmente na Índia com o nome comercial de SallakiTM e na Europa como H15TM [2]. Os triterpenos pentacíclicos majoritários contidos nessas espécies são os ácidos β -boswélico (BA), α -boswélico, 3-acetil- β -boswélico, 3-acetil- α -boswélico, 11-ceto- β -boswélico (KBA), 3-acetil-11-ceto- β -boswélico (AKBA) [3] (fig. 67). Esses ácidos classificam-se com um esqueleto triterpênico do tipo oleanano ou ursano, sendo que esses esqueletos já demonstraram, em outras espécies, atividades farmacológicas interessantes, como analgésica, imunossupressora, antileucêmica, hepatoprotetora, além da ação antiinflamatória [3].

A resina de *B. serrata* também apresentou outros efeitos promissores antiinflamatórios e antitumorais, como inibição da elastase leucocitária humana [4], melhora dos sintomas relacionados à colite [5] e asma brônquica [6]. Estudos revelam que a resina apresentou inibição de topoisomerase I e II α pelos ácidos acetil-boswélicos [7], morte celular de tumores [8], e especialmente o AKBA inibiu o crescimento celular, deteve as células na fase G1 e bloqueou a expressão e função do receptor androgênico em linhagem de células cancerígenas da próstata [9]. Dados indicam que o AKBA aumentou a apoptose induzida por citocinas e agentes quimioterápicos, inibiu a invasão e suprimiu a osteoclastogênese por meio da inibição da expressão do gene regulador NF- κ B [10]. Pesquisas com *B. carteri*, *B. frereana*, *B. sacra* e *B. serrata* demonstraram que essas espécies

inibem enzimas do citocromo P450 [11].

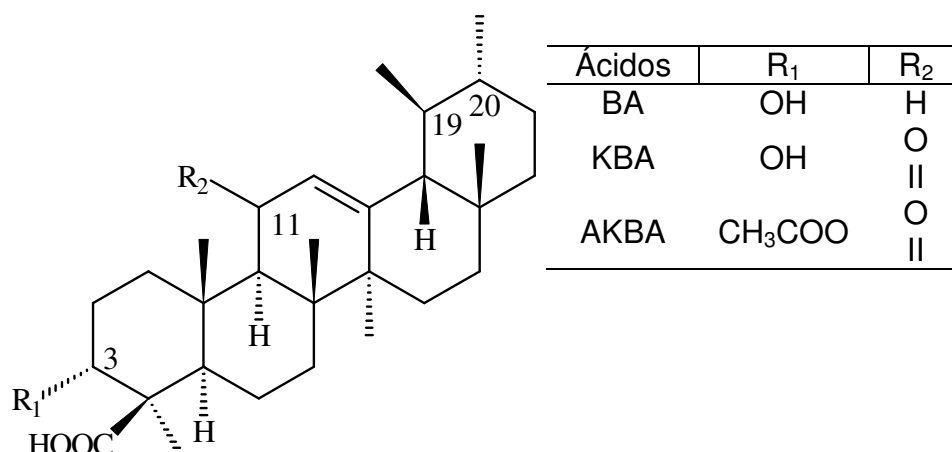


FIGURA 67 – ESTRUTURAS DE ÁCIDOS BOSWÉLICOS PRESENTES NO GÊNERO *BOSWELLIA*

Os fármacos comumente utilizados para o tratamento de doenças inflamatórias são inibidores de ciclooxigenase, antagonistas de leucotrieno e inibidores de lipooxigenase. Os inibidores de 5-lipoxigenase (5-LO), enzima chave da biossíntese de leucotrienos, são objetos de várias pesquisas, tendo em vista a importância das doenças inflamatórias atualmente, bem como a grande quantidade de reações indesejáveis ocasionadas por antiinflamatórios não esteroidais. Inibidores de 5-LO foram encontrados na resina de espécies do gênero *Boswellia* [1][12] e o AKBA apresentou o máximo de inibição de 5-LO, enquanto que o BA apresentou inibição parcial [1]. Trabalhos recentes indicam que os ácidos boswéllicos, principalmente o AKBA, inibem diretamente a COX-1; a ação antiinflamatória, nesse caso, não seria somente pela inibição da 5-LO [13].

1.2 Quantificação de ácidos boswéllicos e validação de método analítico em CLAE

A literatura indica alguns métodos para a quantificação de ácidos boswéllicos por CLAE/UV em resina de *B. serrata* [3][14], bem como em fitoterápicos [15] ou utilizando CLAE/MS [1], além de trabalhos com a quantificação de ácidos boswéllicos em plasma por CLAE/UV [2][16] ou CLAE/MS [17] ou LC/LC/ESI-MS [11].

O extrato da resina comercializado para fins farmacêuticos pode vir das

espécies *B. serrata*, *B. carteri* e *B. frereana*, além de conter outras resinas de plantas. Como a espécie *B. carteri* não apresenta o AKBA [3] e esse demonstrou maior inibição da 5-LO [18], um critério interessante no doseamento seria a quantificação desse ácido em amostras de resina ou de fitoterápicos. Outro ácido que demonstra inibição da 5-LO é o KBA [18]; já o BA é considerado como um marcador do gênero. Nesse sentido, um método que analisasse teores de AKBA, KBA e BA auxiliaria na determinação da qualidade tanto da matéria-prima quanto do produto acabado.

A validação analítica é uma ferramenta para a demonstração de que a metodologia é apropriada para a finalidade pretendida. A validação é orientação da *International Conference of Harmonisation* para testes quantitativos de substâncias ativas em matérias-primas, medicamentos ou componentes do produto farmacêutico [19] e apresenta vários documentos com sugestão de protocolos, para a adequação com relação às recomendações regulatórias dos diversos países interessados [20]-[24]. Considera-se validação como o processo que estabelece, por estudos de laboratório, quais as características de performance que estão de acordo com a aplicação analítica desejada [24].

1.3 Quantificação de ácidos totais e validação de metodologia

Tendo em vista a comercialização de matérias-primas (extratos secos) preparadas à base da resina de *B. serrata*, que são ofertados comercialmente com especificação em ácidos totais, verificou-se a necessidade de desenvolvimento e validação de técnicas que permitam tal conferência técnica.

A quantidade de ácidos totais por titulação em extratos de *B. serrata* é um importante parâmetro da qualidade da matéria-prima, visto que os ácidos boswélicos são ácidos fracos e pouco solúveis em água. Os métodos sugeridos pelos fornecedores englobam titulação em meio não aquoso com metóxido de sódio (base) e dimetilformamida (solvente) [26] ou titulação com solução aquosa de hidróxido de sódio (base) e etanol (solvente), tendo essa última a necessidade de verificar a quantidade de ácidos minerais [27]. A pouca solubilidade dos ácidos boswélicos em água é o fator para a utilização de solventes orgânicos como a dimetilformamida ou o etanol.

2 Objetivo geral e específicos

Geral:

- Desenvolver e validar metodologia analítica para controle de qualidade de *Boswellia serrata* Roxb.

Específicos:

- Desenvolver e validar metodologia analítica por CLAE/UV, visando o doseamento de matéria-prima;
- Desenvolver e validar metodologia analítica por CLAE/UV, visando o doseamento do produto acabado (comprimidos revestidos);
- Desenvolver e validar metodologia analítica por titulometria em meio não aquoso, visando o doseamento de ácidos totais em matéria-prima.

3 Material e métodos

Material vegetal

A resina de *B. serrata* Roxb., comprimidos revestidos (com 350 mg de resina) e o granulado que originou o comprimido, além do granulado-placebo (todos os componentes do comprimido menos a resina) foram cedidos pela empresa Apsen Farmacêutica S/A.

Tratamento dos dados

Os dados foram tratados com o teste Q e fornecidos como intervalo de confiança (limite de confiança a 99%). Como testes estatísticos, usou-se o teste *t* de Student ou o teste *F* para a comparação entre médias ($\alpha=0,05$) [28][29].

1.1 Validação da metodologia de quantificação de ácidos boswélícos

A validação da metodologia seguiu os parâmetros estipulados pela legislação brasileira vigente - Guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos (Resolução RE n° 899, de 29 de maio de 2003) [23], bem como os parâmetros internacionais, além de indicativos em livros e artigos[19]-[25].

3.1.1 Definição do método analítico por CLAE

3.1.1.1 Definição do método de separação e adequação do sistema

Usou-se cromatógrafo líquido de alta eficiência, marca Varian®, com bomba quaternária modelo 9012, injetor automático modelo AI200, alça de 20 μ L e detector DAD, modelo 9065 Varian®. A aquisição dos dados foi obtida por software Star LC Workstation® versão 6.0. A fase estacionária foi uma coluna Varian Res Elut C₁₈, 5 μ m, tamanho de poro de 90 Å, 150 mm x 4,6 mm de diâmetro interno, de aço inoxidável além de coluna guarda com as mesmas

características, entretanto com 10 mm de comprimento.

A água ultrapura, utilizada para essa separação cromatográfica, foi obtida por meio de água bidestilada, purificada por sistema MiliQ - Millipore[®], sendo posteriormente acidificada até pH 3 com H₃PO₄ grau analítico (marca Synth) até pH 3, sendo a solução posteriormente filtrada sob pressão reduzida através de membrana HV (Durapore) em PVDF (fluoreto de polivinilideno), marca Millipore[®] com 0,45 µm de tamanho de poro. A separação cromatográfica da resina e do medicamento foi realizada com fase móvel contendo 80% de acetonitrila grau CLAE (marca JT Baker) em água ultrapura acidificada em modo isocrático por 22 min, seguido de *step* gradiente para 100% de acetonitrila por 2 min, com fluxo de 1 mL.min⁻¹. A estabilização entre corridas foi realizada em 5 min com a fase móvel inicial. A coluna foi mantida na temperatura de 25 °C. Os cromatogramas foram obtidos em 210 e 249 nm (multicanal). Utilizou-se o programa Star Varian para a avaliação dos parâmetros cromatográficos (fator de capacidade – K', número de pratos teóricos - N, fator de caudamento a 5% – T_{5%} e resolução entre dois picos consecutivos – R) [31].

3.1.1.2 Definição do método de extração para CLAE

Dez comprimidos revestidos (ou 3,5 g de resina) foram homogeneizados com gral e pistilo, sendo após extraídos com metanol grau analítico puro, metanol a 80% ou a 90% em água destilada (210 mL). A mistura foi homogeneizada em vórtex Genie 2[®] (10 s), submetida a ultrassom Unique mod. USC 700 (frequência de 40 kHz e potência de 45 Watts) (10 min) e centrifugada em centrífuga Labnet Force 7 (7200 g, 10 min). O sobrenadante foi recolhido em balão volumétrico e o volume completado para 250 mL, originando o extrato. A limpeza do extrato foi obtida com cartucho de SPE previamente limpo com quantidades variadas de metanol (um a seis mL) e, após a eluição total do metanol de limpeza, foi condicionado com água (1 mL). Após, um mL de extrato foi adicionado ao cartucho, eluído com metanol grau CLAE (marca JT Baker) a 90% com água ultrapura em quantidades que variaram de um a quatro mL. O eluato foi aplicado no cromatógrafo. A matéria-prima foi extraída na proporção de 350 mg de resina para 25 mL de volume final de extrato, sendo a limpeza do extrato por SPE realizada de forma idêntica a dos comprimidos revestidos.

3.1.2 Curva analítica e linearidade

Para a confecção das curvas analíticas foram utilizados os padrões grau CLAE dos seguintes ácidos boswéllicos: ácido β -boswéllico (BA), 11-ceto- β -boswéllico (KBA) e 3-acetil-11-ceto- β -boswéllico (AKBA), marca Chromadex. Cinco miligramas de cada ácido foram pesados e solubilizados com metanol, em balão volumétrico (5 mL). Esta solução-estoque foi diluída com metanol para cinco concentrações diferentes na curva analítica. A linearidade foi determinada pela análise das cinco concentrações dos três ácidos escolhidos ($n=3$), definindo-se o intervalo em relação à concentração teórica da amostra [19][23]. Foram definidos: equação da reta, coeficiente de correlação (r) e desvio padrão relativo (DPR%).

3.1.3 Definição da especificidade do método

Foi determinada pela comparação dos resultados obtidos do medicamento contaminado com excesso de excipientes e amostras não contaminadas, demonstrando pelo desvio padrão (DP) e desvio padrão relativo (DPR%) que o resultado do teste não foi afetado. Os picos cromatográficos de interesse tiveram sua pureza garantida por análises com detector de fotodiodos [19][23]. O teste foi realizado com amostras de granulado do comprimido (6 g, peso semelhante a 10 comprimidos revestidos) contendo a resina e foram extraídas conforme o método ($n=3$). Outras amostras (6 g) tiveram a adição de granulado-placebo (500 mg), foram homogeneizadas com gral e pistilo e extraídas conforme o método ($n=3$).

3.1.4 Avaliação da precisão do método

Foi determinada com amostras a 100% da concentração teórica do teste para a forma farmacêutica final (10 comprimidos revestidos, $n=6$). Para a resina foram usadas três concentrações: baixa, média e alta: 250,0 mg, 350,0 mg e 450,0 mg, extraídas com 25 mL cada (originando 10, 14 e 18 mg.mL^{-1} de extrato)

(n=3) [19][23], sendo extraídas conforme o método.

3.1.5 Definição da exatidão do método

A resina de *B. serrata* (1,400 g) foi homogeneizada com gral e pistilo, extraída conforme o método determinado e quantificada pelo método descrito em CLAE (n=3). Essa resina foi nomeada extrato padronizado. A exatidão foi determinada com quantidades conhecidas de extrato padronizado (71,43%, 100% e 128,57%) a uma quantidade de granulado-placebo, sendo posteriormente calculada a recuperação dos ácidos em relação à quantidade adicionada [19][23][25]. Quantidades de extrato padronizado (1,000; 1,400 e 1,800 g) foram misturadas ao granulado-placebo (1 g), originando uma massa semelhante a de 4 comprimidos revestidos (n=3). Cada mistura foi extraída com 100 mL de metanol, conforme o método.

3.1.6 Definição da robustez do método

As avaliações foram feitas em relação ao método cromatográfico e método de extração e preparação de amostra (n=3) [19][23][25]. Com relação à identidade dos picos em análise, utilizaram-se como parâmetros o espectro em UV obtido e o tempo de retenção dos padrões nas condições avaliadas. As mudanças na preparação da amostra foram: alteração da quantidade de resina no mesmo volume de líquido extrator: as quantidades de 250,0 mg, 350,0 mg e 450,0 mg de resina foram extraídas com iguais volumes de líquido extrator (n=3); alteração do tempo de extração: dez comprimidos revestidos foram reunidos e extraídos conforme o método citado, com a variação do tempo em ultrassom - 5 min e outro lote com 15 min (n=3).

As análises no método cromatográfico foram feitas em replicata (n=3). Abrangeram: variação do pH da fase móvel: a água foi substituída por um tampão fosfato em pH 4 e por tampão em pH 6, ambos a 5 mM; proporções da fase móvel variadas: a concentração foi alterada de 80% de acetonitrila em água para 83% de acetonitrila em água e para 77% de acetonitrila em água; fluxo de fase móvel alterado: o fluxo foi alterado de 1 mL.min⁻¹ para 1,2 mL.min⁻¹ e para 0,8 mL.min⁻¹.

Avaliou-se t_r (tempo de retenção), K' (fator capacidade), N (número de pratos teóricos), R (resolução) e $T_{5\%}$ (caudamento do pico a 5%).

3.2 Determinação dos teores de ácidos boswélícos em resina e em produto acabado

Para o doseamento da matéria-prima, a resina de *B. serrata* Roxb. (1,400 g) foi extraída nas proporções/condições citadas e quantificada pelo método em CLAE ($n=3$). O produto acabado (comprimido revestido) foi quantificado conforme procedimento descrito em farmacopéia ($n=10$) [32], considerando as mesmas proporções e condições.

3.3 Quantificação de ácidos totais em extratos

3.3.1 Preparação e padronização das soluções

3.3.1.1 Secagem do biftalato de potássio (padrão primário)

Adicionaram-se cerca de 2 g de biftalato de potássio grau analítico (marca Biotec) em pesa-filtro seco devidamente tarado e esse foi seco a 105 °C em estufa de secagem por 4 h. Após isso, o pesa-filtro foi retirado da estufa e resfriado até temperatura ambiente em dessecador, sendo posteriormente pesado. O procedimento de secagem foi repetido até que duas pesagens consecutivas não variassem mais do que cerca de 5 mg.

3.3.1.2 Padronização da solução de NaOH 0,05 M

Pesou-se exatamente cerca de 0,100 g de biftalato de potássio e dissolveu-se em cerca de 100 ml de água destilada e livre de CO₂. Adicionaram-se 12 gotas de solução indicadora de azul de timol (0,150% p/v em etanol), e titulou-se com solução aquosa de NaOH (grau analítico, marca Biotec) 0,05 M até a solução adquirir coloração verde persistente por um minuto. O volume gasto foi anotado (V_p) e o procedimento repetido três vezes ($n=3$). A partir da média dos

dados, tratados com o teste Q, calculou-se a concentração real da solução preparada de NaOH como sendo próxima da concentração 0,05 M. Utilizou-se para tal a massa molar do biftalato de potássio, que é de $204,22 \text{ g.mol}^{-1}$.

3.3.2 Doseamento dos ácidos orgânicos totais

3.3.2.1 Doseamento dos ácidos solúveis em água

Pesou-se exatamente cerca de 1,000 g de extrato seco e transferiu-se para um erlenmeyer. O pó foi disperso por agitação manual em 100 mL de água medidos em pipeta volumétrica e, em seguida, a mistura foi submetida a ultrassom marca Unique por 10 min. Após isso, a mistura foi aquecida em banho-maria a 60°C por 30 min. A mistura foi resfriada, filtrada sob pressão reduzida e o líquido foi titulado lentamente (uma gota a cada 10 s) com NaOH 0,05 M padronizado com 12 gotas de solução indicadora alcoólica de azul de timol, sob agitação magnética, até a viragem do indicador (coloração verde). Anotou-se o volume gasto (V_a) e repetiu-se o procedimento três vezes ($n=3$). Foi feito um branco com a água e indicador, anotando o volume utilizado ($V_{\text{água}}$), repetindo-se duas vezes ($n=3$). O volume correspondente aos ácidos solúveis em água foi calculado (V_{asa}) conforme a equação 4:

$$V_{\text{asa}} = V_a - V_{\text{água}} \quad (\text{EQUAÇÃO 4})$$

Calculou-se quanto esse volume de ácidos forneceria de ácidos totais solúveis em água, relativo à massa pesada, considerando-se que a massa molar do BA é de 456 g.mol^{-1} e a estequiometria de neutralização do BA com o NaOH foi de 1:1. O teor de BA na tomada de amostra (1,000 g) foi expresso em percentual.

3.3.2.2 Doseamento dos ácidos totais solúveis em etanol

Entre os ácidos totais solúveis em etanol estão os ácidos boswéllicos. Pesaram-se exatamente cerca de 0,300 g de extrato seco, dispersando-se em 50

ml de etanol (marca Nuclear) medidos em pipeta volumétrica. A mistura foi submetida a ultrassom marca Unique por 10 min. Foram acrescentadas 12 gotas de solução de azul de timol e a mistura foi titulada lentamente (uma gota a cada 10 s) com solução aquosa de NaOH 0,05 M padronizado, com agitação da solução de extrato seco no agitador magnético até a viragem do indicador – coloração verde. O volume gasto foi anotado (V_b) e o procedimento repetido três vezes ($n=3$). Foi feito um branco com o etanol e o indicador, anotando o volume utilizado (V_{etanol}) e o procedimento repetido duas vezes ($n=3$). O volume correspondente aos ácidos totais solúveis em etanol (V_{atse}) foi calculado segundo a equação 5:

$$V_{\text{atse}} = V_b - V_{\text{etanol}} \quad (\text{EQUAÇÃO 5})$$

Calculou-se quanto esse volume de ácidos forneceria de ácidos totais solúveis em etanol relativo à massa pesada, considerando-se que a massa molar do ácido β -boswéllico é de 456 g.mol^{-1} e a estequiometria de neutralização do ácido β -boswéllico com o NaOH foi de 1:1. Após o cálculo da quantidade de ácido β -boswéllico na tomada de amostra (0,300 g), esse foi expresso em percentual.

3.3.3 Curva analítica e linearidade

Determinou-se pela análise de cinco concentrações de um ácido orgânico, insolúvel em água e solúvel em etanol, o ácido benzóico (grau analítico, marca F. Maia), previamente dessecado até peso constante em estufa de secagem a $100 - 105^\circ\text{C}$. Foram utilizadas cinco concentrações diferentes em replicata ($n=3$) para a curva analítica, determinando-se assim a linearidade, definindo-se o intervalo em relação à concentração teórica da amostra [19][23]. Foram definidos: equação da reta e coeficiente de correlação (r). A massa de ácido benzóico foi solubilizada em etanol para a titulação em meio não aquoso com solução aquosa de NaOH 0,05 M (solução recentemente preparada e padronizada), sendo a determinação da acidez do etanol previamente calculada.

3.3.4 Avaliação da precisão do método

Foi determinada com três concentrações de ácido benzóico (0,050; 0,062 e 0,070 g), sendo o ensaio feito com replicatas (n=5) [19][23], sendo extraídas conforme o método. Analisou-se o DPR% das amostras, para demonstrar se os resultados são precisos ou não.

3.3.5 Definição da exatidão do método

Uma parte do extrato foi homogeneizada com gral e pistilo e mensurada conforme o método de titulação descrito. Esse extrato foi nomeado extrato padronizado. A quantidade de 0,300 g desse extrato foi misturada a quantidades conhecidas de ácido benzóico como padrão. Três concentrações de ácido benzóico foram usadas: 0,015; 0,025 e 0,035 g (n=3). A mistura foi extraída nas mesmas condições/proporções do método definido, sendo calculada a recuperação do ácido benzóico em relação à quantidade adicionada [19][23][25]. A exatidão dos valores foi mensurada nesse caso, por meio da recuperação, conforme a equação 6:

$$\text{RECUPERAÇÃO\%} = \frac{\text{Me} \times 100}{\text{CT}} \quad (\text{EQUAÇÃO 6})$$

e pela determinação do erro relativo (ER%), dado pela equação 7:

$$\text{ER\%} = \frac{(\text{CT} - \text{Me}) \times 100}{\text{CT}} \quad (\text{EQUAÇÃO 7})$$

onde Me é a média da concentração dos valores e CT é a concentração teórica adicionada [23]. Além disso, avaliou-se, com os resultados obtidos no teste de precisão, os critérios de Recuperação% e o erro relativo (ER%) para confirmação da exatidão do método.

3.3.6 Definição da robustez do método

As modificações foram feitas em relação ao método de extração (ou preparação da amostra) [19][23][25] e avaliadas com o teste *t*. As variações foram:

a) alteração do tempo de extração: cerca de 0,300 g de extrato seco foram extraídos com etanol com variação do tempo em ultrassom - 5 min e outro lote com 20 min - e o extrato foi titulado nas mesmas condições, sendo o ensaio realizado com replicatas (n=3).

b) alteração do solvente de extração: os solventes alternativos foram a dimetilformamida grau analítico (marca Merck) (DMF) e o metanol grau analítico (marca Merck). Cerca de 0,300 g de extrato seco foram extraídos com 50 ml de DMF ou de metanol, e o extrato titulado nas mesmas condições, sendo cada ensaio feito com replicatas (n=3), além de ser realizada a mensuração da acidez de cada solvente.

c) alteração da temperatura de extração: o extrato seco foi extraído nas mesmas condições do método, com variação na temperatura do ultrassom: 30 °C e 40 °C.

4 Resultados e discussão

4.1 Validação da metodologia de quantificação de ácidos boswéllicos

4.1.1 Definição do método analítico por CLAE

4.1.1.1 Definição do método de separação e adequação do sistema

O cromatograma (fig. 68) apresenta a separação das substâncias em análise, sendo o AKBA e o KBA analisados em 249 nm e o BA analisado em 210 nm, com a identificação por perfil no UV e co-eluição dos padrões nas amostras. Os resultados do fator de capacidade (K'), número de pratos teóricos (N), fator de caudamento ($T_{5\%}$) e resolução entre dois picos consecutivos (R) estão listados na tab. 19.

TABELA 19 - RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DE ADEQUAÇÃO DO SISTEMA

Substância	N	K'	R	$T_{5\%}$
KBA	6683	4,18	1,1	1,17
AKBA	8687	7,58	4,9	1,14
BA	9918	18,01	16	1,44

N - Número de pratos teóricos
 R - Resolução entre dois picos consecutivos
 K' - Fator de capacidade
 $T_{5\%}$ - Caudamento a 5%

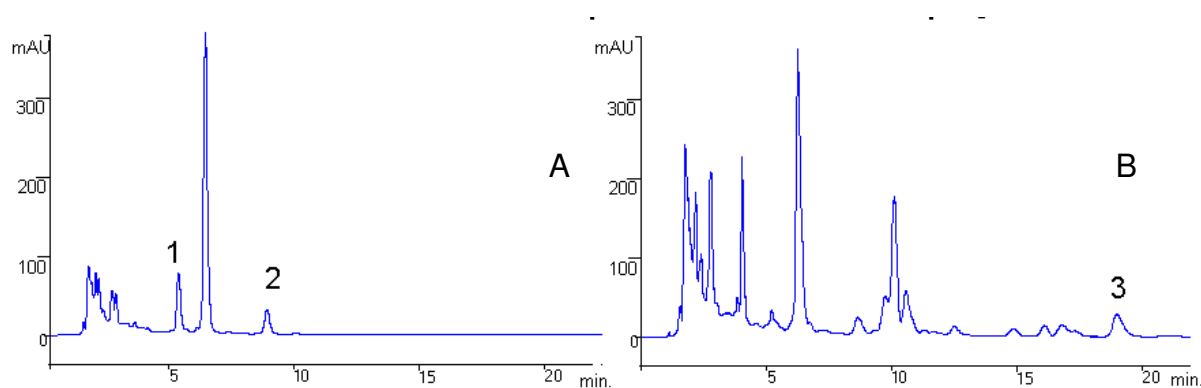


FIGURA 68 - CROMATOGRAMAS OBTIDOS DA RESINA DE *B. serrata* ROXB.*
 *Cromatograma A (249 nm): 1- KBA (5,18 min), 2- AKBA (8,58 min). Cromatograma B (210 nm): 3- BA (19 min)

Idealmente, as separações são feitas em condições nas quais os fatores de capacidade dos solutos em uma mistura estão entre 2 e 10 [31] ou maiores

que 2 [30]. O valor alto de K' relativo ao BA reflete que esse composto foi o último a ser eluído. O caudamento está de acordo com o recomendado ($T_{5\%} \leq 2$), bem como o número de pratos teóricos, que deve ser superior a 2000 [30]. Com relação à resolução o ideal é que os picos apresentem $R > 2$ [30], o que aconteceu com as substâncias AKBA e com BA. Valores de R entre 1 e 2 demonstram que os picos estão separados, mas podem se sobrepor caso as condições cromatográficas mudem – nesse caso, o ensaio de robustez indica que a sobreposição não ocorreu. Valores de $R < 1$ significam que ocorreu sobreposição de picos.

4.1.1.2 Definição do método de extração para CLAE

O melhor solvente de extração foi o metanol, na proporção de 350,0 mg de resina para cada 25 mL. Na SPE, percebeu-se que o volume de 2 mL de metanol a 90% eluiu todos os ácidos de interesse; após esse volume os ácidos não foram verificados por CLAE. A SPE de C_{18} retém as substâncias mais apolares, que podem aderir na coluna e diminuir a vida útil da mesma. Isso foi percebido nos cromatogramas realizados com amostras que passaram pela SPE ou não: as amostras que não passaram pela SPE apresentaram cromatogramas com mais substâncias após 25 min (mais apolares), enquanto que os cromatogramas de amostras preparadas com SPE não tiveram substâncias eluindo após 25 min.

4.1.2 Curva analítica e linearidade

Os intervalos nas cinco concentrações de cada ácido foram: 101,15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ - 850,00 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de BA; 17,850 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ – 150,00 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de AKBA; e 25,000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ – 300,00 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de KBA. Todas as curvas apresentaram resultados satisfatórios, com o $r > 0,99$ [23]. O intervalo sugerido para testes de uniformidade de conteúdo é de 70-130% da concentração teórica [23]. Como o teor de ácidos boswélícos varia bastante, o intervalo foi definido entre 30 a 350% da concentração teórica do teste. As equações de reta, DPR% e r estão na tab. 20.

TABELA 20 - DADOS DE LINEARIDADE PARA O KBA, AKBA E BA

Ácidos	Equação de reta	DPR%	r
AKBA	$Y = 2,1545 \times 10^3 X - 8,8704 \times 10^3$	6,5040	0,99760
KBA	$Y = 1,9422 \times 10^3 X - 1,1993 \times 10^4$	5,9881	0,99952
BA	$Y = 5,0201 \times 10^2 X - 9,4981 \times 10^3$	5,7632	0,99811

DPR% - desvio padrão relativo

r – coeficiente de correlação

4.1.3 Definição da especificidade do método

A especificidade determina se o método é seletivo em relação a outras substâncias presentes. Os picos cromatográficos de interesse tiveram sua pureza garantida por análises realizadas com detector de fotodiodos demonstrando que o pico cromatográfico e o perfil de espectro no UV foi atribuído a um só componente, sendo o método seletivo. A adição de 8,33% de placebo (500 mg) nas amostras (6,00 g) não alterou o resultado do doseamento: não há diferença significativa entre teor de ácidos em amostras contendo ou não granulado-placebo (tab. 21) pelo teste *t*.

TABELA 21 - ESPECIFICIDADE DE GRANULADO CONTAMINADO E NÃO CONTAMINADO E TEOR DE BA, KBA E AKBA

Granulado	Teor de BA (% em granulado)	Teor de KBA (% em granulado)	Teor de AKBA (% em granulado)
Média - amostras contaminadas (+8,33% placebo)	2,57 ± 0,0700	0,853 ± 0,0201	0,480 ± 0,0121
DP	0,0502	0,0104	0,0106
DPR%	1,83	1,55	1,88
Média - amostras não contaminadas	2,64 ± 0,143	0,870 ± 0,0402	0,494 ± 0,0305
DP	0,0904	0,0311	0,0201
DPR%	3,56	3,28	4,55

DP – desvio padrão

DPR% - desvio padrão relativo

4.1.4 Avaliação da precisão do método

Uma metodologia é considerada precisa quando os dados avaliados estão próximos, numa série de medidas de amostragem múltipla da mesma amostra. A precisão intra-corrida, ou repetibilidade, consta da concordância entre resultados em um curto período de tempo com o mesmo analista e instrumentação. Para matéria-prima, são necessárias avaliações em três concentrações: baixa, média e alta, em relação à concentração teórica do teste. A concentração teórica do teste foi considerada como 350,0 mg de resina, que é a

concentração aproximada do comprimido revestido. A metodologia é precisa, pois a maioria dos resultados de DPR% foi inferior a 5%, apresentando repetibilidade (tab. 22).

TABELA 22 - REPETIBILIDADE DO TEOR DE BA, KBA E AKBA EM RELAÇÃO À RESINA OU O COMPRIMIDO REVESTIDO

Teste de repetibilidade	Comprimidos revestidos (n=6)	Extrato padronizado (n=3) de resina	Concentrações de resina (n=3)		
			Baixa	Média	Alta
Média – BA%	3,198 ± 0,07860	5,564 ± 0,1484	5,667 ± 0,2311	5,647 ± 0,3651	5,575 ± 0,3259
DP	0,07460	0,09965	0,1551	0,2451	0,2188
DPR%	2,333	1,791	2,738	4,341	3,924
Média – KBA%	1,018 ± 0,03311	1,728 ± 0,02433	1,765 ± 0,08543	1,745 ± 0,08940	1,785 ± 0,1846
DP	0,03142	0,01634	0,05733	0,06001	0,1239
DPR%	3,0876	0,9456	3,247	3,440	6,943
Média – AKBA%	0,5480 ± 0,01723	0,8491 ± 0,01963	0,8392 ± 0,04140	0,8681 ± 0,05780	0,8684 ± 0,04842
DP	0,01634	0,01320	0,02781	0,03870	0,03252
DPR%	2,826	1,553	3,313	4,470	3,743

Aplicando-se o teste *F*, percebeu-se que as amostras e o extrato padronizado não tem diferença significativa ($p > 0,05$). Os comprimidos revestidos (n=6) apresentaram valores próximos, inclusive com o DPR% inferior a 5% [23].

4.1.5 Definição da exatidão do método

A exatidão avalia a proximidade dos resultados obtidos em relação ao valor verdadeiro [19][24]. Como não foi possível obter amostras com todos os componentes do medicamento menos os analitos de interesse (pois o ativo é uma resina vegetal), optou-se por adicionar quantidades conhecidas do extrato padronizado aos outros componentes do comprimido revestido [24]. O valor obtido do extrato padronizado mais o placebo foi comparado ao valor verdadeiro (extrato padronizado). Os teores dos ácidos, em diferentes concentrações e no extrato padronizado, não apresentaram diferença significativa entre si no teste *F* ($p > 0,05$), confirmando a exatidão e a precisão. O percentual do valor obtido em relação ao valor verdadeiro (recuperação) variou entre 98,820 a 102,89% (fig. 69).

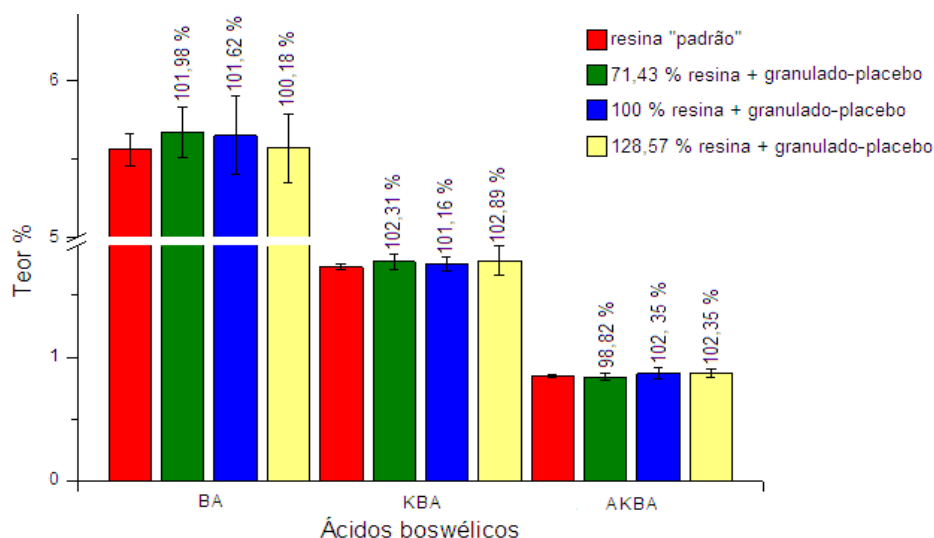


FIGURA 69 - RECUPERAÇÃO DOS ÁCIDOS BOSWÉLICOS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE RESINA DE *B. serrata* COM GRANULADO-PLACEBO

4.1.6 Definição da robustez do método

Na escolha dos critérios de avaliação de robustez, é importante que as condições de desafio simulem aquelas a serem encontradas durante as análises [20]. Nessas condições, o método deve fornecer os picos de interesse separados. Percebe-se que, em relação às variações no preparo da amostra, as alterações da concentração da resina e de tempo de extração não demonstraram influência no teor de ácidos boswéllicos analisados. As quantidades de 250,0 mg, 350,0 mg e 450,0 mg de resina foram extraídas com o mesmo volume de líquido extrator e analisadas por CLAE, não apresentando diferença significativa de concentração final de resina pelo teste F ($p > 0,05$). Na variação do tempo em ultrassom, dez comprimidos revestidos foram extraídos por 5 min e outro lote com 15 min, e o extrato foi injetado no cromatógrafo. Não teve diferença significativa entre as extrações no teste F ($p > 0,05$).

Com relação às variações no método cromatográfico, os resultados apresentaram, entre as replicatas, DPR% menor que 5%, de acordo com a legislação brasileira [23]. As variações encontradas (t_r , N , K' , R , T) estão representadas na tab. 23.

Percebeu-se que as variações do método cromatográfico não ocasionaram interposição nos picos, demonstrando que o método é resistente a

pequenas e deliberadas variações. Entretanto, para uma quantificação adequada em condições diferentes das utilizadas na curva analítica, uma nova curva analítica deverá ser construída, pois há modificação na área dos picos, alterando assim o resultado.

TABELA 23 - ROBUSTEZ DO SISTEMA EM RELAÇÃO AO MÉTODO CROMATOGRÁFICO

Condições	Substância	t_r	N	K'	R	T _{5%}
Condições normais	KBA	5,1	8739	4,08	2,3	1,2
	AKBA	8,4	8961	7,4	4,0	1,11
	BA	18,5	10341	17,55	2,6	1,34
pH 4	KBA	5,0	5411	4,04	1,3	1,65
	AKBA	8,3	6578	7,34	2,6	1,75
	BA	18,3	9724	17,34	2,2	2,14
pH 6	KBA	5,1	5122	4,10	1,0	1,41
	AKBA	8,5	6043	7,48	2,5	1,71
	BA	18,9	7767	17,88	2,0	2,18
Fluxo 0,8 mL.min ⁻¹	KBA	6,7	9339	5,66	1,53	1,53
	AKBA	11,0	9825	10,05	3,5	1,12
	BA	25,4	11992	24,44	2,9	1,34
Fluxo 1,2 mL.min ⁻¹	KBA	4,3	6306	3,27	1,8	1,43
	AKBA	7,1	7829	6,08	2,7	1,10
	BA	15,8	8778	14,75	2,5	1,34
Fase móvel 77:23	KBA	6,3	6618	5,28	2,0	1,13
	AKBA	11,1	8495	10,13	1,3	1,10
	BA	24,0	55932	23,00	1,9	1,70
Fase móvel 83:27	KBA	4,6	6791	3,56	2,3	1,33
	AKBA	7,1	8020	6,06	3,6	1,14
	BA	15,7	9182	14,66	2,9	1,35

t_r – tempo de retenção (min) N - Número de pratos teóricos T_{5%} - caudamento a 5%
K' - Fator de capacidade R - Resolução entre dois picos consecutivos

4.2 Determinação dos teores de ácidos boswélicos em resina e em produto acabado

Os resultados das análises de amostras de resina de *B. serrata*, publicados na literatura, demonstram uma grande variação das quantidades de ácidos boswélicos existentes (tab. 24), provavelmente devido às diferenças sazonais, edáficas ou mesmo de mistura de várias espécies para a obtenção da resina. Percebe-se que os resultados obtidos no doseamento da resina (tab. 25) estão próximos dos valores obtidos por alguns autores.

TABELA 24 - CONCENTRAÇÕES DE KBA, AKBA E BA, CITADAS EM LITERATURA

Concentrações	% - KBA	% - AKBA	% - BA
Resina indiana ^A	2,02	1,43	4,60
Resina africana ^A	1,01	4,70	3,72
Resina <i>B. serrata</i> 1 ^B	1,38	5,40	1,34
Resina <i>B. serrata</i> 2 ^B	0,09	0,15	0,16
Resina <i>B. serrata</i> 3 ^B	0,58	4,07	3,16
Resina <i>B. serrata</i> 4 ^B	0,05	0,31	0,10
Resina <i>B. serrata</i> 5 ^B	0,04	0,05	0,17
Resina <i>B. serrata</i> 6 ^C	1,72	0,86	5,89
Resina <i>B. serrata</i> 7 ^C	1,80	1,07	4,47

Fonte: ^A - [15]; ^B - [3]; ^C - [14]

TABELA 25 - CONCENTRAÇÕES DE KBA, AKBA E BA ENCONTRADAS EM COMPRIMIDOS REVESTIDOS (N=10) E RESINA ANALISADA (N=3) (%)

Concentrações	% - KBA	% - AKBA	% - BA
Resina <i>B. serrata</i>	1,73 ± 0,02	0,85 ± 0,02	5,56 ± 0,15
Comprimidos revestidos avaliados	0,98 ± 0,02	0,48 ± 0,01	2,67 ± 0,06

4.3 Quantificação de ácidos totais em extratos

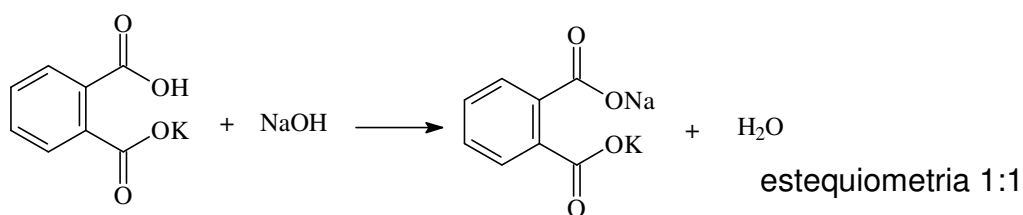
4.3.1.1 Padronização da solução de NaOH 0,05 M

Os resultados da padronização estão resumidos na tab. 26. Os valores obtidos forneceram um intervalo de confiança de $10,2 \pm 0,4$ mL.

TABELA 26 - VALORES DA PADRONIZAÇÃO DE SOLUÇÃO AQUOSA DE NaOH 0,05 M.

Replicata	Massa pesada (g)	Volume gasto (mL) - Vp
1	0,1012	9,8
2	0,1049	10,2
3	0,1086	10,5
Média	0,1049	10,2

Isso permitiu calcular a concentração real da solução de NaOH, perante a reação:



Então, conclui-se que a molaridade real da solução aquosa de NaOH é de 0,0505 M.

4.3.2 Doseamento dos ácidos orgânicos totais

4.3.2.1 Doseamento dos ácidos solúveis em água

Os resultados estão sumarizados na tab. 27.

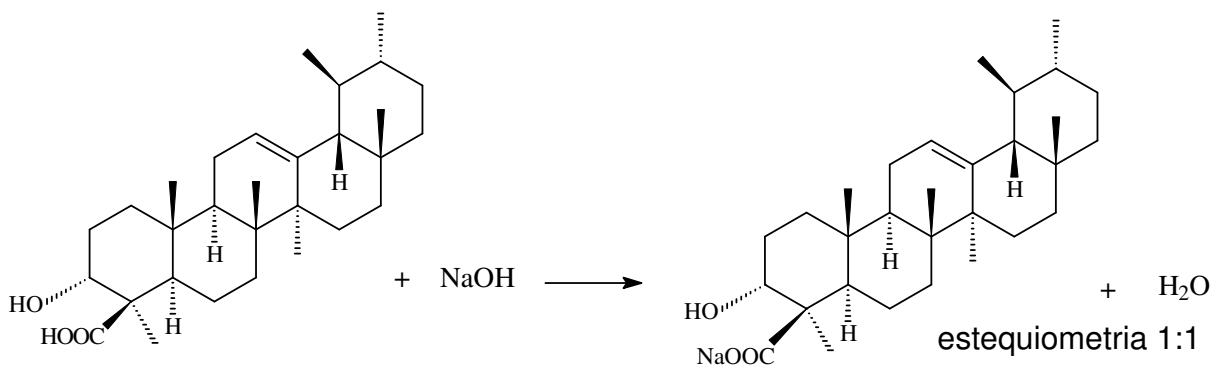
TABELA 27 - RESULTADOS DA TITULAÇÃO DO EXTRATO SECO EM ÁGUA COM SOLUÇÃO AQUOSA DE NaOH 0,0505 M.

Replicata	Massa de extrato (g)	V _a (mL)	V _{água} (mL)
1	1,0000	0,1	0,05
2	1,0000	0,1	0,05
3	1,0000	0,1	0,05
Média	1,0000	0,1	0,05

V_a – volume gasto de NaOH a 0,0505 M na titulação com extrato

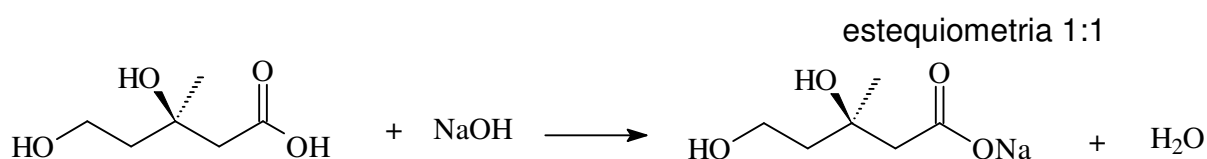
V_{água} – volume gasto de NaOH a 0,0505 M na titulação com água

Portanto, conforme a equação 4, o volume gasto para os ácidos totais solúveis em água seria de 0,05 mL. Os fornecedores de extratos dispõem os resultados de ácidos totais solúveis em água como sendo em BA. Portanto, o resultado foi calculado como sendo em BA, sendo a reação:



fornecendo 0,12% de ácidos solúveis em água como ácido β -boswélico no extrato de *B. serrata* Roxb.

Todavia, esse resultado se aplica a ácidos solúveis em água, presentes na matéria-prima. Os ácidos boswélicos são muito pouco solúveis em água. Então, uma sugestão é que esse valor fosse expresso em outro ácido, como por exemplo, o ácido mevalônico, que é o precursor na biossíntese dos ácidos boswélicos [33] e é extremamente solúvel em água [34]. A reação do NaOH com o ácido mevalônico segue o mesmo padrão de estequiometria da reação de neutralização com NaOH:



Nesse caso, como a massa molar do ácido mevalônico é de $148,16 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, o valor de acidez seria de 0,037% de ácidos solúveis em água como ácido mevalônico no extrato de *B. serrata* Roxb.

4.3.2.2 Doseamento dos ácidos totais solúveis em etanol

Os resultados das massas pesadas de extrato seco de *B. serrata* Roxb., dos volumes gastos na titulação do etanol e da porção do extrato solúvel em etanol estão resumidos na tab. 28. O intervalo de confiança foi de $11,2 \pm 0,113$ mL de NaOH a 0,0505 M. Com base nesse valor, a quantidade de ácidos totais solúveis em etanol, expressa em ácido β -boswélico foi de $85,14 \pm 0,9169\%$.

TABELA 28 - RESULTADOS DA TITULAÇÃO DE EXTRATO SECO EM ETANOL COM SOLUÇÃO AQUOSA DE NaOH 0,05 M

Replicata	Massa de extrato seco (g)	V _b (mL)	V _{etanol} (mL)	BA (g)	%
1	0,3007	11,1	0,1	0,2535	84,31
2	0,3004	11,3	0,1	0,2581	85,92
3	0,3003	11,2	0,1	0,2558	85,19
Média	0,3005	11,2	0,1	0,2558	85,14
DP	0,0002082	0,1		0,2558	0,8103
DPR%	0,06927	0,8929		0,002305	0,9517

V_b - volume gasto de NaOH 0,0505 M na titulação do extrato seco

DP - desvio padrão

V_{etanol} - volume gasto de NaOH 0,0505 M na titulação do etanol

DPR% - desvio padrão relativo

BA - quantidade de ácidos totais expressa em BA na tomada de amostra

4.3.3 Curva analítica e linearidade

Para essa determinação, escolheu-se um ácido orgânico, pouco solúvel em água e solúvel em etanol, o ácido benzóico. Definiu-se que a equação da reta é $Y = 161,947.X + 0,00751$, com $r = 0,99996$, dada pela relação entre o volume de NaOH gasto e a quantidade de ácido benzóico pesada (fig. 70).

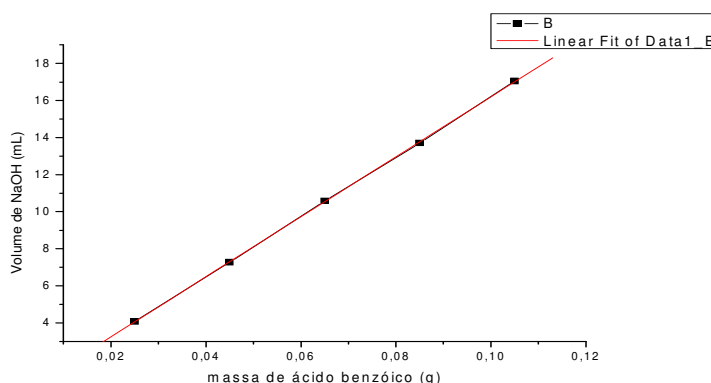


FIGURA 70 - CURVA ANALÍTICA DO ÁCIDO BENZÓICO NA VOLUMETRIA EM MEIO NÃO AQUOSO COM NaOH 0,05 M

A quantidade de 0,0650 g de ácido benzóico foi escolhida como ponto 3 da curva porque o número de moles dessa massa é igual ao número de moles de ácido (expresso em ácido β -boswéllico) em 0,300 g de amostra com teor de ácidos igual a 85%. A relação entre a massa de ácido e o volume de base foi linear no intervalo e o coeficiente de correlação obtido está de acordo com o definido para métodos analíticos, que é no mínimo de 0,99 [23]. O intervalo obtido abrange 38,7% a 162% da concentração teórica do teste, adequado para o tipo de análise [23].

4.3.4 Avaliação da precisão do método

O teste de repetibilidade analisa as proximidades dos resultados entre si. Os resultados não apresentaram variações significativas entre as replicatas, visto que os DPR% situaram-se entre 0,787-1,51% (desvio padrão relativo menor que 5%) (tab. 29), bem como mantiveram a linearidade com as diferentes concentrações. A variação permitida pela legislação vigente [23] é um DPR% de,

no máximo, 5%, portanto o método foi considerado preciso. Quando os dados são analisados conforme a recuperação, percebeu-se que os resultados também foram exatos, pois o percentual de recuperação foi extremamente próximo a 100%.

TABELA 29 - RESULTADOS DA TITULAÇÃO DE ÁCIDO BENZÓICO EM ETANOL COM SOLUÇÃO AQUOSA DE NaOH 0,05 M NO ENSAIO DE REPETIBILIDADE

Valores obtidos na titulação	Massas de ácido benzóico (g)		
	0,050	0,062	0,070
Média (g)	0,049	0,062	0,070
DP	0,00050	0,00090	0,00060
DPR%	1,0	1,5	0,79
Recuperação%	98 ± 0,88	100 ± 1,3	100,2 ± 0,67
ER%	2,0	0	-0,14

Média (g) - g de ácido benzóico encontrada por meio da titulação

DPR% - desvio padrão relativo

DP – desvio padrão

ER - erro relativo%

4.3.5 Definição da exatidão do método

Uma parte do extrato foi homogeneizada com gral e pistilo e mensurada conforme o método de titulação descrito. Esse extrato foi nomeado extrato padronizado. A quantidade de 0,300 g desse extrato foi misturada a quantidades conhecidas de ácido benzóico como padrão e novamente submetida à extração, definindo-se assim quanto de ácido foi recuperado. Nesse teste verificou-se a interferência da matriz: em valores menores a recuperação foi menor e que em valores maiores adicionados de ácido benzóico aumentou-se a recuperação; entretanto, os valores sempre apresentaram-se precisos (DPR% menor que 5%) (fig. 71 e tab. 30). Portanto, em valores muito baixos, a recuperação foi inferior a 90%, o que é facilmente explicado pois quanto menores foram os valores mensurados, maior é o erro relativo da análise.

TABELA 30 - RESULTADOS DA TITULAÇÃO DE ÁCIDO BENZÓICO EM ETANOL, NA PRESENÇA DE EXTRATO DE *B. serrata* COM SOLUÇÃO AQUOSA DE NaOH 0,05 M NO ENSAIO DE EXATIDÃO

Valores obtidos na titulação	Massas de ácido benzóico (g) adicionadas ao extrato de <i>B. serrata</i>		
	0,015	0,025	0,035
Recuperação%	83,11 ± 3,05	88 ± 1,57	96,57 ± 1,12
DP	2,69	1,37	0,99
DPR%	3,24	1,58	1,02
ER%	16,67	12	3,43

DP – desvio padrão

DPR% - desvio padrão relativo

ER - erro relativo%

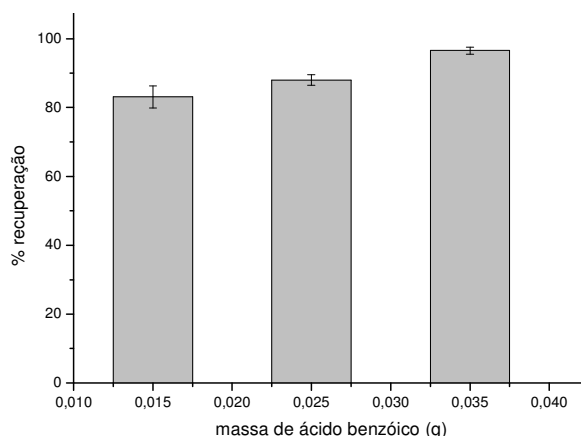


FIGURA 71 - RECUPERAÇÃO DO ÁCIDO BENZÓICO NA PRESENÇA DE EXTRATO SECO DE *B. serrata* EM ETANOL, TITULADO COM SOLUÇÃO AQUOSA DE NaOH 0,05 M

4.3.6 Definição da robustez do método

Em relação a todas as variações testadas - alteração do tempo de extração em ultrassom - 5 min e 20 min; alteração do solvente de extração: DMF e metanol; alteração da temperatura de extração a 30 °C e 40 °C - nenhuma apresentou diferença significativa entre as modificações no teste *t* (*t* tabelado com $\alpha = 0,05$ para 4 graus de liberdade = 2,776), realizado com a resina de *B. serrata* (tab. 31). Portanto, o método é robusto frente às modificações testadas.

TABELA 31 - RESULTADOS DO TESTE DE ROBUSTEZ PARA A VALIDAÇÃO DE ÁCIDOS TOTAIS NA TITULAÇÃO DE EXTRATO DE *B. serrata*

Robustez	Variação de tempo		Variação de solvente		Variação de temperatura	
	5 min	20 min	DMF	metanol	30 °C	40 °C
Média	86,32±0,1168	86,31±0,6205	87,25±0,6856	84,39±0,9202	84,38±0,1021	86,23±1,087
DP	0,1032	0,5484	0,6059	0,8132	0,0902	0,9605
DPR%	0,1196	0,6354	0,6944	0,9636	0,1069	1,1137
<i>t</i>		0,006758		2,699		1,787

5 Conclusão

Um método simples e rápido foi desenvolvido e validado para a análise por CLAE de KBA, AKBA e BA, podendo ser aplicado em rotina analítica de controle de qualidade, tanto para matéria-prima quanto para comprimidos revestidos. O método demonstrou ser linear, preciso, exato, seletivo e robusto nas condições avaliadas. Além disso, um método para doseamento de ácidos orgânicos totais, solúveis em etanol, foi desenvolvido e validado para ser usado em rotina analítica de controle de qualidade de matéria-prima. O método foi linear, preciso, exato e robusto nas condições avaliadas.

Referências bibliográficas

- [1] SCHWEIZER, S. VON BROCKE, S. A. F. W.; BODEN, S. E.; BAYER, E.; AMMON, H. P. T.; SAFAYHI, H. Workup-Dependent Formation of 5-Lipoxygenase Inhibitory Boswellic Acid Analogues. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 8, p. 1058-1061, 2000.
- [2] TAWAB, M. A.; KAUNZINGER, A.; BAHR, U.; KARAS, M.; WURGLICS, M.; SCHUBERT-ZSILAVECZ, M. Development of a high-performance liquid chromatographic method for the determination of 11-keto- β -boswellic acid in human plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 761, n. 2, p. 221-227, 2001.
- [3] GANZERA, M.; KHAN, I. A. A reversed phase high performance liquid chromatography method for the analysis of boswellic acids in *Boswellia serrata*. **Planta Medica**, v. 67, n. 8, p. 778-780, 2001.
- [4] SAFAYHI, H.; RALL, B.; SAILER, E. R.; AMMON, H. P. T. Inhibition by boswellic acids of human leukocyte elastase. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 281, n. 1, p. 460 – 463, 1997.
- [5] GUPTA, I.; PARIHAR, A.; MALHOTRA, P.; SINGH, G. B.; LÜDTKE, R.; SAFAYHI, H.; AMMON, H. P. T. Effects of *Boswellia serrata* gum resin in patients with ulcerative colitis. **European Journal of Medical Research**, v. 2, n. 1, p. 37-43, 1997.
- [6] GUPTA, I.; GUPTA, V.; PARIHAR, A.; GUPTA, S.; LÜDTKE, R.; SAFAYHI, H.; AMMON, H. P. T. Effects of *Boswellia serrata* gum resin in patients with bronchial asthma: results of a double-blind, placebo-controlled, 6-week clinical study. **European Journal of Medical Research**, v. 3, n. 11, p. 511-514, 1998.
- [7] SYROVETS, T.; BÜCHELE, B.; GEDIG, E.; SLUPSKY, J. R.; SIMMET, T. Acetyl-boswellic acids are novel catalytic inhibitors of human topoisomerases I and II α . **Molecular Pharmacology**, v. 58, n. 1, p. 71-81, 2000.
- [8] HOERNLEIN, R. F.; ORLIKOWSKI, T.; ZEHRER, C.; NIETHAMMER, D.; SAILER, E. R.; SIMMET, T.; DANNECKER, G. E.; AMMON, H. P. T. Acetyl-11-keto-boswellic acid induces apoptosis in hl-60 and ccrf-cem cells and inhibits topoisomerase I. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 288, n. 2, p. 613-619, 1999.
- [9] YUAN, H. Q.; KONG, F.; WANG, X. L.; YOUNG, C. Y. F.; HU, X. Y.; LOU, H. X. Inhibitory effect of acetyl-11-keto- β -boswellic acid on androgen receptor by interference of Sp1 binding activity in prostate cancer cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 75, n. 11, p. 2112–2121, 2008.
- [10] TAKADA, Y.; ICHIKAWA, H.; BADMAEV, V.; AGGARWAL, B. B. Acetyl-11-keto- β -boswellic acid potentiates apoptosis, inhibits invasion, and abolishes osteoclastogenesis by suppressing NF- κ B and NF- κ B-regulated gene expression. **The Journal of Immunology**, v. 176, n. 5, p. 3127–3140, 2006.
- [11] FRANK, A.; UNGER, M. Analysis of frankincense from various *Boswellia* species with inhibitory activity on human drug metabolising cytochrome P450 enzymes using liquid chromatography mass spectrometry after automated on-line extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1112, n. 1-2, p. 255–262, 2006.
- [12] SAFAYHI, H.; MACK, T.; SABIERAJ, J.; ANAZODO, M. I.; SUBRAMANIAN, L. R.; AMMON, H. P. T. Boswellic acids: novel, specific, nonredox inhibitors of 5-

- lipoxygenase. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 261, n. 3, p. 1143-1146, 1992.
- [13] SIEMONEIT, U.; HOFMANN, B.; KATHER, N.; LAMKEMEYER, T.; MADLUNG, J.; FRANKE, L.; SCHNEIDER, G.; JAUCH, J.; POECKEL, D.; WERZ, O. Identification and functional analysis of cyclooxygenase-1 as a molecular target of boswellic acids. **Biochemical Pharmacology**, v. 75, n. 2, p. 503–513, 2008.
- [14] SUBBARAJU, G. V.; SRIDHAR, P.; RAMAKRISHNA, S.; SREEMANNARAYANA, A.; VANISREE, M.; BABU, S. K. Isolation and HPLC estimation of six boswellis acids from *Boswellia serrata* extract. **Asian Journal of Chemistry**, v. 16, n. 3-4, p. 1824-1832, 2004.
- [15] BÜCHELE, B.; ZUGMAIER, W.; SIMMET, T. Analysis of pentacyclic triterpenic acids from frankincense gum resins and related phytopharmaceuticals by high-performance liquid chromatography. Identification of lupeolic acid, a novel pentacyclic triterpene. **Journal of Chromatography B**, v. 791, n. 1-2, p. 21-30, 2003.
- [16] BÜCHELE, B.; SIMMET, T. Analysis of 12 different pentacyclic triterpenic acids from frankincense in human plasma by high-performance liquid chromatography and photodiode array detection. **Journal of Chromatography B**, v. 795, n. 2, p. 355-362, 2003.
- [17] KAUNZINGER, A.; BAUMEISTER, A.; CUDA, K.; HÄRING, N.; SCHUG, B.; BLUME, H. H.; RADDATZ, K.; FISCHER, G.; SCHUBERT-ZSILAVECZ, M. Determination of 11-keto-boswellic acid in human plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 28, n. 3-4, p. 729–739, 2002.
- [18] AMMON, H. P.; MACK, T.; SINGH, G. B.; SAFAYHI, H. Inhibition of leukotriene B₄ formation in rat peritoneal neutrophils by an ethanolic extract of the gum resin exudate of *Boswellia serrata*. **Planta Medica**, v. 57, n. 3, p. 203-207, 1991.
- [19] ICH - INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. **Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)**, 2005, 17 p. Disponível em <<http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf>> Acesso em 11 ago. 2006.
- [20] FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guidelines on general principles of process validation**, 1987, 14 p. Disponível em <<http://www.fda.gov/cdrh/ode/425.pdf>> Acesso em 11 ago. 2006.
- [21] FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guidance for industry (draft), analytical procedures and methods validation**, 2000, 37 p. Disponível em <<http://www.fda.gov/cder/guidance/2396dft.pdf>> Acesso em 13 set. 2007.
- [22] BOULANGER, B.; CHIAP, P.; DEWE, W.; CROMMEN, J.; HUBERT, P. An analysis of the SFSTP guide on validation of chromatographic bioanalytical methods: progresses and limitations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 32, n. 4-5, p. 753-765, 2003.
- [23] BRASIL. Resolução RE nº 899, 29 de maio de 2003. Guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **D.O.U. – Diário oficial da união**; poder executivo, de 02 de junho de 2003.
- [24] HUBERT, PH.; NGUYEN-HUU, J.-J.; BOULANGER, B.; CHAPUZET, E.; CHIAP, P.; COHEN, N.; COMPAGNON, P.-A.; DEWÉ, W.; FEINBERG, M.; LALLIER, M.; LAURENTIE, M.; MERCIER, N.; MUZARD, G.; NIVET, C.; VALAT, L. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal - part I. **Journal of Pharmaceutical**

- and Biomedical Analysis**, v. 36, n. 3, p. 579-586, 2004.
- [25] USP 28 NF 23. General information <1225>, Validation of Compendial Methods. In: **The united states pharmacopoeia - the national formulary**. Rockville: United States Pharmacopeial Convention Inc, 2005. 1 CD-ROM.
- [26] KANCOR NUTRACEUTICALS. **Method of estimation of Boswellic acids content**. 1 p. Kerala: Kancor Flavours, 2002.
- [27] NATURAL REMEDIES. **Boswellia serrata – Master document: estimation of total organic acids as boswellic acid by titration**. p. 17. Bangalore: Natural Remedies.
- [28] SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J. Application of Statistics to Data Treatment and Evaluation. In:--. **Fundamentals of analytical chemistry**, Forth Worth: Saunders, 1996, p. 47-70.
- [29] VIEIRA, S. **Estatística experimental**. 2. ed. São Paulo: Atlas, 1999.
- [30] FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Reviewer guidance: validation of chromatographic methods. center for drug evaluation and research (CDER)**, 1994, 33 p. Disponível em <<http://www.fda.gov/cder/guidance/cmc3.pdf>> Acesso em 11 ago. 2006.
- [31] SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN. T. A. Introdução às Separações Cromatográficas. In:--. **Princípios de análise instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002, p. 598-617.
- [32] USP 28 NF 23. General information <905>, Uniformity of Dosage Units. In: **The united states pharmacopoeia - the national formulary**. Rockville: United States Pharmacopeial Convention Inc, 2005. 1 CD-ROM.
- [33] DEWICK, P. M. **Medicinal natural products – a biosynthetic approach**. Chichester: John Wiley & Sons, 1997, p. 155.
- [34] THE merck index. Mevalonic acid. **The merck index**, version 12.3, 20. ed. New Jersey: Champman & Hall/CRC, 2000, 1 CD-ROM.